

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



**Estudo da Fragmentação do DNA em Espermatozoides  
Humanos após Separação por MACS**

**Sara Ventura Bucar**

Dissertação  
Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

**2014**



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



**Estudo da Fragmentação do DNA em Espermatozoides  
Humanos após Separação por MACS**

**Sara Ventura Bucar**

Dissertação

Mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento

Orientadora Externa: Professora Doutora Rosália Sá

Orientadora Interna: Professora Doutora Gabriela Rodrigues

**2014**



*À minha Mãe,  
O grande pilar da minha vida.*



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Mário Sousa por me ter possibilitado a realização de um estágio laboratorial e de um trabalho de investigação na área da Reprodução Medicamente Assistida, área em que sempre almejei trabalhar. Os conselhos, o nível de exigência e rigor foram muito importantes.

Por toda a ajuda, paciência e disponibilidade a todas as horas, agradeço profundamente à minha orientadora Professora Doutora Rosália Sá. A amizade, apoio e conselhos prestados ao longo deste ano foram essenciais para mim e para a minha formação e evolução no “mundo” científico. Sem eles a realização deste trabalho teria sido muito mais difícil. Muito obrigada!

Agradeço também à minha orientadora interna, Professora Doutora Gabriela Rodrigues, por me ter aberto uma janela quando as portas se fecharam. Por ter estado sempre disponível para qualquer dúvida ou pedido, com extrema simpatia.

Os meus agradecimentos ao Professor Doutor Alberto Barros, diretor do Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros (CGR), pois sem a sua colaboração este trabalho não teria sido possível de realizar. A todos os colaboradores do CGR agradeço o carinho e simpatia com que diariamente me receberam, especialmente à Dra. Ana Gonçalves, Dra. Cláudia Osório e Dr. Nuno Barros.

Agradeço igualmente aos Professores Doutores Mário Sousa, Rosália Sá e Alberto Barros pela disponibilização de todo o equipamento, reagentes e consumíveis necessários à realização do trabalho conducente à minha dissertação de Mestrado. Agradeço também ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) por me ter acolhido e proporcionado todas as condições necessárias.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório de Biologia Celular do ICBAS, especialmente às técnicas Ângela Alves e Elsa Oliveira, por nunca me terem dito que “não” e por toda a boa disposição e positividade que me transmitiram sempre.

Os meus sinceros agradecimentos ao Professor Doutor Eduardo Rocha, que me auxiliou e orientou no tratamento estatístico dos dados. Obrigada pela simpatia com que sempre me recebeu e por não me ter deixado desanimar mesmo quando o cenário parecia negro!

A realização desta dissertação só foi possível graças à minha Mãe. Obrigada por sempre me teres dado tudo e por teres estado sempre do meu lado, a amparar-me nas minhas quedas. O teu apoio e amor foram imprescindíveis para que conseguisse ultrapassar mais esta etapa. Adoro-te!

Ao meu Pai. Mesmo longe, as tuas palavras e carinho foram importantes, adoro-te!

Aos meus queridos padrinhos, Luís e Cecília. Ao meu padrinho, obrigada por toda a força e motivação em todas as fases da minha vida. Os teus conselhos foram essenciais. Adoro-te e admirar-te-ei sempre! À minha madrinha, por ter sempre uma palavra de alento para me dar.

À minha avó Emília, pela constante preocupação com o meu bem-estar e por todo o carinho. Ao meu avô Octávio, que partiu o ano passado, mas que estaria certamente orgulhoso de mim. Nunca te esquecerei!

A todas as pessoas que, de uma forma ou outra, influenciaram as minhas escolhas e o caminho que percorri. Em especial ao Sérgio, que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos e teve sempre um ombro e uma palavra amiga para me dar. À Catarina, por me ter ouvido e ajudado sempre que precisei durante este último ano.

Por último, agradeço ao Artur. Obrigada por teres embarcado comigo em mais esta aventura, que teria sido muito mais difícil, se não impossível, sem ti. Por todo o amor e carinho a todas as horas, mas principalmente por toda a paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, em que não me deixaste desanimar. Amo-te!



## Resumo

O espermograma é uma ferramenta fundamental no diagnóstico da infertilidade masculina. Neste exame são avaliados diversos parâmetros dos espermatozoides, como a concentração, motilidade, morfologia, vitalidade e integridade da membrana. Contudo, o espermograma não avalia a integridade do DNA dos espermatozoides, e danos nesta estrutura têm sido relacionados a falhas nos tratamentos de Reprodução Medicamente Assistida (RMA). Com o objetivo de isolar espermatozoides livres de danos no DNA, a técnica *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS) foi aplicada para complementar as técnicas clássicas de preparação dos espermatozoides para RMA.

No presente trabalho foram processadas 100 amostras de sêmen de acordo com diferentes combinações de MACS e técnicas de preparação dos espermatozoides clássicas, incluindo a centrifugação por gradientes de densidade (DGC) e o *swim-up* (SU). O objetivo consistiu em verificar se, após os protocolos aplicados, ocorria uma diminuição significativa do número de espermatozoides com fragmentação do DNA (sDNAfrag), e determinar qual o protocolo mais eficiente nessa redução.

Os resultados obtidos mostraram que todos os grupos apresentaram uma redução significativa da sDNAfrag, com a maior taxa de redução ( $83,3 \pm 15,4\%$ ) a verificar-se com o protocolo MACS-DGC-SU. Com este protocolo, verificou-se que pacientes com valores diminuídos para a motilidade progressiva, vitalidade e integridade da membrana dos espermatozoides alcançaram uma maior redução de sDNAfrag. Além disso, pacientes com valores abaixo dos valores de referência para a motilidade progressiva rápida, ou para a motilidade progressiva rápida e morfologia normal, obtiveram também uma maior redução de sDNAfrag do que pacientes com valores abaixo dos valores de referência para a morfologia normal.

Tendo em conta estes resultados, a técnica MACS demonstra potencial para otimizar a taxa de redução de sDNAfrag, quando aplicada antes da DGC e do SU, especialmente em amostras de sêmen cujos espermatozoides apresentem motilidade progressiva, vitalidade e integridade da membrana diminuídas.

**Palavras-chave:** apoptose; fragmentação do DNA; espermatozoides; TUNEL; MACS

## Abstract

Spermogram analysis is a fundamental tool in the diagnosis of male infertility that evaluates several sperm parameters such as concentration, motility, morphology, vitality and membrane integrity. However, it does not evaluate sperm DNA integrity and sperm DNA injuries have been related to Assisted Reproduction Treatment failures. To isolate sperm without DNA damage, Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) was employed as an adjunct of the classic sperm preparation techniques.

In the present study 100 semen samples were processed according to different combinations of MACS with other classic sperm preparation techniques that included density gradient centrifugation (DGC) and swim-up (SU) methods. The aim of the study was to evaluate whether there was a significant decrease in the number of sperm with fragmented DNA (sDNAfrag) after the protocol applied and verify which protocol was the most efficient in reducing sDNAfrag.

The results showed that all groups presented a significant decrease in sDNAfrag, with the highest reduction rate ( $83.3 \pm 15.4\%$ ) being obtained with the protocol MACS-DGC-SU. With this protocol, patients with worst values in the semen regarding sperm progressive motility, vitality and membrane integrity achieved the best sDNAfrag reduction. Moreover, patients whose semen presented values above the reference for rapid progressive motility, or rapid progressive motility and normal morphology, showed a higher sDNAfrag reduction rate than patients with values above the reference value for normal morphology.

Based on the results obtained, MACS showed potential to optimize the sDNAfrag reduction rate when applied before DGC and SU, especially in semen samples with low progressive motility, vitality and membrane integrity.

**Keywords:** apoptosis; DNA fragmentation; sperm; TUNEL; MACS

## Índice

Agradecimentos	i
Resumo e Palavras-chave	iii
Abstract and Keywords	iv
Índice de Figuras e Diagramas	vii
Índice de Tabelas	viii
Acrónimos, Abreviaturas e Siglas	ix
 1. Introdução	
1.1. Espermatogénese	1
1.2. Espermatozoide Humano	2
1.3. Parâmetros Seminais	4
1.4. Principais Causas de Alteração dos Parâmetros Seminais	5
1.5. Apoptose	6
1.6. Fragmentação do DNA em Espermatozoides (sDNAfrag)	8
1.7. <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> (MACS)	11
 2. Objetivos	15
 3. Materiais e Métodos	
3.1. Considerações Éticas	16
3.2. Pacientes	16
3.3. Espermograma	16
3.4. Desenho Experimental	17
3.5. Preparação dos Espermatozoides	17
3.6. Isolamento de Espermatozoides Não-Apoptóticos (MACS)	18
3.7. Determinação de sDNAfrag ( <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling</i> )	18
3.8. Análise Estatística	19

4. Resultados	
4.1. Idade, Parâmetros Seminais e sDNAfrag no Ejaculado	20
4.2. Redução de sDNAfrag	21
4.3. Eficácia da Redução de sDNAfrag	21
4.4. Eficácia da Redução de sDNAfrag e Parâmetros Seminais	22
4.5. Eficácia da Redução de sDNAfrag em Subgrupos	23
5. Discussão	25
6. Bibliografia	31
Anexos	
Anexo Ia. Valores de Referência dos Parâmetros Seminais Avaliados no Espermograma (WHO, 2010)	43
Anexo Ib. Patologias Associadas à Qualidade dos Parâmetros Seminais (WHO, 2010)	44
Anexo II. Protocolo de Exame Microscópico de Espermograma	45
Anexo III. Protocolo de Preparação do Sémen	47
Anexo IV. Protocolo da Técnica TUNEL ( <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling</i> )	57

## Índice de Figuras e Diagramas

Figura 1. Regulação endócrina da espermatogénese	1
Figura 2. Representação esquemática de um espermatozoide humano. Cedido por Mário Sousa (ICBAS)	3
Figura 3. Detecção de fragmentação no DNA num espermatozoide morfológicamente normal pela técnica <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling</i> (TUNEL)	19
Diagrama 1. Protocolo experimental. Metodologias clássicas para processamento de sémen (Grupo 1) e em combinação com a técnica <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> (MACS) (Grupos 2-5)	17

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros seminais dos pacientes e percentagem de fragmentação do DNA no ejaculado	20
Tabela 2. Fragmentação do DNA nos espermatozoides no ejaculado (T0) e após tratamento (T1)	21
Tabela 3. Redução de espermatozoides com fragmentação do DNA após tratamento (subgrupos)	24

## Acrónimos, Abreviaturas e Siglas

A – astenozoospermia

AT – astenoteratozoospermia

CGR – Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros

CMA3 – cromomicina A3

COMET – *single cell gel electrophoresis*

CS – células de Sertoli

DGC – centrifugação por gradientes de densidade

dUTP – nucleótidos deoxyuridina trifosfatados

FITC – isocianato de fluoresceína

FSH – hormona folículo-estimulante

GnRH – hormona libertadora de gonadotrofinas

ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

ICSI – microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide

IUI – inseminação intrauterina

IVF – fertilização *in vitro*

LH – hormona luteinizante

MACS – *Magnetic-Activated Cell Sorting*

MOI – microscópio ótico invertido

NZ – normozoospermia

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – tampão salino fosfato

PI – peça intermédia

PS – fosfolípido fosfatidilserina

RMA – Reprodução Medicamente Assistida

SCSA – *Sperm Chromatin Structure Assay*

sDNAfrag – espermatozoides com fragmentação do DNA

SPM – *sperm preparation medium*

SU – *swim-up*

T – teratozoospermia

TA – temperatura ambiente

TdT – transferase deoxinucleotidil terminal

TS – túbulos seminíferos

TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*

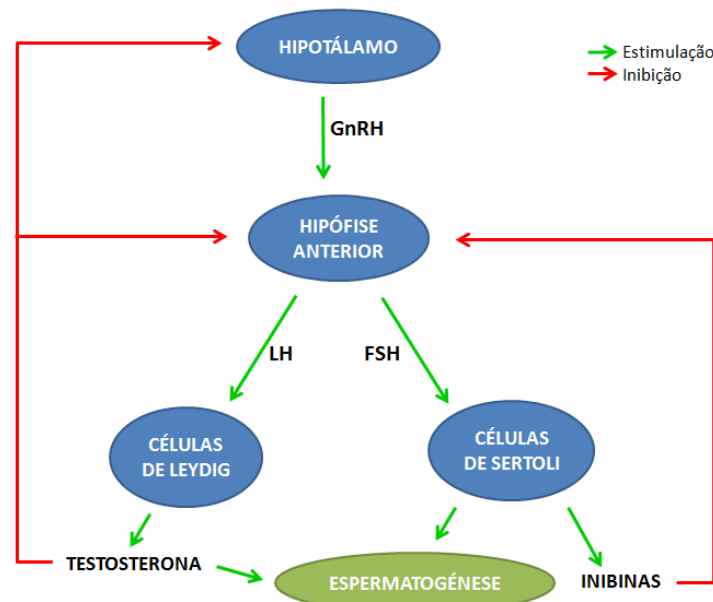


## 1. Introdução

### 1.1. Espermatogénese

A espermatogénese é um processo que ocorre nos túbulos seminíferos (TS) e envolve a diferenciação de espermatozoides a partir de células estaminais germinativas (Roosen-Runge, 1977). No tecido conjuntivo que envolve os TS residem as células de Leydig, cuja principal função é segregar testosterona e estradiol. Os TS são delimitados por uma lâmina basal e contêm o epitélio germinal em associação íntima com células somáticas de suporte, as células de Sertoli (CS) (Weinbauer *et al.*, 2010). As CS encontram-se unidas através de junções ocludentes, construindo uma barreira hemato-testicular que impede o acesso das células do sistema imune às células germinais diferenciadas (Kopera *et al.*, 2010). As CS são também responsáveis pela secreção de fatores de crescimento e proteínas que estimulam a espermatogénese, bem como pela fagocitose das células apoptóticas (Weinbauer *et al.*, 2010).

A regulação endócrina da espermatogénese depende de um ciclo de *feedback* negativo clássico (**Fig. 1**), envolvendo interações entre o hipotálamo, a hipófise e os testículos (eixo hipotálamo-hipófise-gónadas) (O'Donnell *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Regulação endócrina da espermatogénese.

GnRH, hormona libertadora de gonadotrofinas; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona foliculo-estimulante.

Os principais reguladores endócrinos da espermatogénese são as gonadotrofinas hormona luteinizante (**LH**) e hormona foliculo-estimulante (**FSH**), produzidas pela

hipófise anterior e libertadas para a corrente sanguínea em resposta ao estímulo da hormona libertadora de gonadotrofinas (**GnRH**), segregada pelo hipotálamo. A LH atua nas células de Leydig, estimulando a secreção de testosterona. Esta, uma vez nas CS, promove as funções destas células. O mesmo sucede com a FSH (**O'Donnell et al., 2006**).

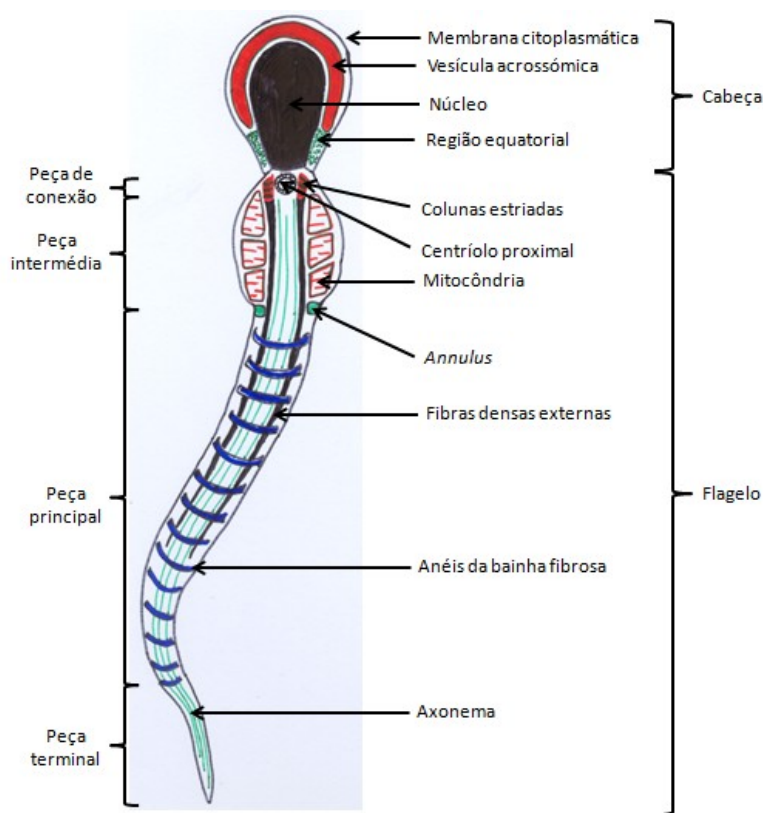
Em contacto com a lâmina basal, existem dois tipos de espermatogónias, A-dark (estaminais) e A-pale (**Amann, 2008**). As A-dark originam as A-pale e estas entram em proliferação até ao estadio de espermatócito. As divisões celulares são incompletas, pelo que as células se encontram interligadas através de pontes citoplasmáticas, permitindo uma coordenação metabólica e da expressão génica, e originando uma sincronização no desenvolvimento das células germinativas ao longo do epitélio seminífero. Na fase de leptóteno ocorre a replicação do DNA, seguindo-se as restantes fases da profase, zigóteno e paquíteno (recombinação homóloga). Sucede-se metafase-I, anafase-I e a telofase-I, originando-se duas células com metade dos cromossomas da célula original, mas igual conteúdo cromossómico, os espermatócitos secundários. Verifica-se então uma rápida divisão celular (meiose II), originando-se quatro células haploides, os espermatídios redondos. Durante a espermiogénese, os espermatídios sofrem modificações estruturais e moleculares: o núcleo alonga-se e a sua cromatina condensa-se, devido à substituição de histonas por protaminas; forma-se a vesícula acrossómica, que se alonga ao longo dos 2/3 apicais do núcleo; e surge o flagelo (centríolos, mitocôndrias, axonema e fibras acessórias). Terminado este processo, os espermatozoides libertam-se das CS (**espermição**) para o lúmen dos TS, e prosseguem pela rede testicular até ao epidídimo. Aí, ficam armazenados até à ejaculação, sofrendo numerosas alterações bioquímicas que os tornam móveis e capazes de fecundação (**Holstein et al., 2003; Kerr et al., 2006**).

## 1.2. Espermatozoide Humano

Os espermatozoides são células altamente especializadas que, por possuírem uma série de características funcionais e estruturais específicas, têm a capacidade única de transmitir a informação genética paterna ao ovócito (**Eddy, 2006**). A sua constituição inclui a cabeça e a cauda (ou flagelo) (**Sutovsky & Manandhar, 2006**).

Os espermatozoides (**Fig. 2**) possuem cerca de 60 µm de comprimento, 55 µm dos quais pertencem ao flagelo (**Eddy, 2006**). O reduzido volume celular permite

aumentar as propriedades hidrodinâmicas dos espermatozoides, facilitando desta forma a fertilização do ovócito (Sutovsky & Manandhar, 2006).



**Figura 2.** Representação esquemática de um espermatozoide humano. Cedido por Mário Sousa (ICBAS).

A cabeça do espermatozoide contém o núcleo, que está rodeado pela teca perinuclear, uma estrutura rígida de citoesqueleto, e pela vesícula acrossômica, a qual possui diversas enzimas hidrolíticas que funcionarão na penetração do revestimento externo dos ovócitos, a zona pelúcida (Sutovsky & Manandhar, 2006).

O flagelo é composto por quatro segmentos: peça de conexão (centríolo proximal e colunas estriadas), peça intermédia (PI) (axonema, fibras densas externas e bainha mitocondrial), peça principal (axonema, fibras densas externas e bainha fibrosa), e peça terminal (axonema e bainha fibrosa) (Sutovsky & Manandhar, 2006). O axonema é formado durante a espermiogénese a partir do centríolo distal, o qual sofre de seguida despolimerização. É constituído por 9 dupletos de microtúbulos periféricos (A-completo, B-incompleto), ligados por pontes de nexina, sendo que o microtúbulo A apresenta dois braços de dineína (ATPases). Estão ligados a um par simples central através de projeções radiais. A motilidade do axonema deve-se ao deslizamento dos dupletos entre si, e é controlada por fatores oriundos do par central e transmitidos pelas projeções radiais para as pontes de nexina, as quais por sua vez regulam a atividade das

dineínas (Eddy, 2006). O ATP mitocondrial é sobretudo utilizado nos processos de transformação membranar que ocorrem durante a estadia nos epidídimos (maturação), durante o trajeto pela cavidade uterina (capacitação), e penetração das células foliculares que revestem o ovócito ovulado. O ATP gasto na motilidade é oriundo da glicólise que ocorre através de um sistema enzimático presente na bainha fibrosa (Williams & Ford, 2001).

### 1.3. Parâmetros Seminais

A infertilidade é uma doença reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e considera-se que um casal é infértil quando após um ano de vida sexual ativa, sem utilização de métodos contraceptivos, não consegue alcançar a gravidez desejada, ou após duas gravidezes não levadas a termo (ASRM, 2013). Estima-se que 15% dos casais em idade reprodutiva sofra desta doença, com a infertilidade masculina a contribuir para cerca de metade dos casos (Sharlip *et al.*, 2002).

A análise do sémen (espermograma) constitui um dos passos mais importantes na avaliação da infertilidade masculina. Os parâmetros seminais são avaliados segundo critérios estabelecidos pela OMS: número total de espermatozoides (indicador da capacidade de produção dos testículos e da desobstrução do sistema de canais pós-testiculares), volume do fluido seminal (indicador da atividade secretora das glândulas anexas), motilidade, morfologia e vitalidade (WHO, 2010).

Imediatamente após a ejaculação, e após completa liquefação, a análise começa por um exame macroscópico, onde são avaliados os seguintes parâmetros: volume, pH, viscosidade, aparência e odor. O limite inferior de referência para o volume é de 1,5 ml por ejaculado e, enquanto pouco volume de sémen é indicador de obstrução nos canais ejaculatórios ou ejaculação retrógrada parcial, um volume elevado reflete um aumento secretório por parte das glândulas anexas, normalmente devido a inflamação. O pH do sémen reflete o balanço entre os valores de pH das diferentes secreções que o constituem, principalmente da secreção vesicular seminal (alcalina) e da secreção prostática (ácida). Um valor de pH 7,2 é considerado normal, constituindo o limite inferior de referência. Uma viscosidade aumentada pode influenciar a determinação de outros parâmetros seminais, como a motilidade ou a concentração. Uma amostra de sémen pouco opaca pode significar que a concentração de espermatozoides presente é muito baixa, enquanto uma amostra avermelhada pode indicar a presença de eritrócitos.

Em relação ao odor, um cheiro fétido sugere infecção, enquanto a ausência de cheiro sugere alterações na composição do líquido seminal (WHO, 2010).

De seguida procede-se à análise microscópica, onde são avaliados os seguintes parâmetros: concentração, motilidade, morfologia, vitalidade e hipoosmolaridade. O limite inferior de referência para a concentração é de 15 milhões de espermatozoides por ml, e indica a capacidade de produção testicular (WHO, 2010). A motilidade é dividida em progressiva rápida (elevada capacidade fecundante), progressiva lenta, não progressiva e nula. A motilidade é considerada dentro de valores normais quando existem pelo menos 50% de espermatozoides com motilidade progressiva (rápida e lenta) ou pelo menos 25% de espermatozoides com motilidade progressiva rápida (WHO, 1999). A morfologia dos espermatozoides tem como limite inferior os 4%, sendo que as anomalias da cabeça estão sobretudo associadas a lesões do DNA, enquanto as do flagelo com a capacidade de locomoção pelos tratos genitais (WHO, 2010). O teste da vitalidade permite distinguir espermatozoides vivos de espermatozoides mortos, enquanto o teste hipoosmótico testa a integridade da membrana citoplasmática do flagelo. Para ambos os testes, o valor limite são 58% de espermatozoides (WHO, 2010).

Os valores de referência dos parâmetros seminais acima referidos e a classificação das patologias respetivas podem ser consultados no **Anexo I**.

#### **1.4. Principais Causas de Alteração dos Parâmetros Seminais**

A infertilidade masculina pode dever-se a inúmeras causas, desde anomalias urogenitais, a infeções no trato urogenital, anomalias genéticas, distúrbios endócrinos, fatores imunológicos, tóxicos ambientais e profissionais, bem como a fatores ligados ao estilo de vida (Campagne, 2013; Jungwirth *et al.*, 2013). Ainda assim, existe um grupo de pacientes cuja infertilidade é idiopática, podendo os seus parâmetros seminais apresentar-se normais ou subnormais (Tüttelmann & Nieschlag, 2010).

Das anomalias mais frequentes, destacam-se a criptorquidia (descida incompleta dos testículos para o escroto, ficando na região abdominal ou no canal inguinal), e o varicocelo (o aumento da temperatura escrotal aumenta o *stress* oxidativo e a fragmentação do DNA) (Zini & Dohle, 2011; Jungwirth *et al.*, 2013).

As lesões genéticas mais frequentes são as anomalias cromossómicas (numéricas e estruturais-translocações); as microdeleções da região AZF do cromossoma Y,

causadoras de oligozoospermia severa e azoospermia secretora; e as mutações no gene da Fibrose Quística, causadoras de agenesia bilateral dos canais deferentes (azoospermia obstrutiva). Das anomalias cromossômicas, o Síndrome de Klinefelter (47, XXY) constitui o maior grupo de pacientes (Vogt, 2006).

O estilo de vida, bem como fatores ambientais, também afetam negativamente a fertilidade masculina. Por exemplo, o consumo de álcool (Muthusami & Chinnaswamy, 2005), tabaco (Ragheb & Sabanegh Jr, 2009), drogas e anabolizantes (Fronczak *et al.*, 2012) afetam a concentração, motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides, bem como podem induzir lesões do DNA. Neste grupo, as infecções genitais são uma das principais causas de azoospermia obstrutiva. A capacidade reprodutora masculina é também ameaçada por fatores ambientais, como a exposição a metais pesados (Gomes *et al.*, 2014), químicos (pesticidas), poluição e radiação (Campagne, 2013). Por outro lado, as lesões decorrentes de traumatismos medulares em desportos radicais e acidentes de viação provocam anejaculação. Outros fatores com impacto negativo na fertilidade masculina incluem a obesidade, disruptores endócrinos presentes em comidas e no ambiente, sobreaquecimento do escroto e o *stress* (Campagne, 2013). A idade masculina também tem impacto na qualidade dos espermatozoides, estando associadas anomalias cromossômicas com compromisso da fertilidade e da gravidez a partir dos 40 anos de idade (Kühnert & Nieschlag, 2004).

## 1.5. Apoptose

A homeostasia tecidual implica uma regulação entre proliferação e morte celular. Através de um processo designado morte celular programada, cuja forma mais comum e melhor compreendida é a apoptose, células envelhecidas, irremediavelmente danificadas, que sejam desnecessárias ou uma ameaça para o organismo, podem ser eliminadas de forma rápida e organizada (Alberts *et al.*, 2007).

Durante a apoptose observam-se as seguintes alterações morfológicas: retração celular e nuclear, separação da matriz extracelular e das células vizinhas, condensação e marginalização da cromatina contra a membrana nuclear, formação de prolongamentos da membrana citoplasmática, condensação e fragmentação do núcleo e, por fim, formação de corpos apoptóticos (organelos celulares e fragmentos nucleares envolvidos por membrana citoplasmática). Estes são depois rapidamente fagocitados e digeridos

por macrófagos e células vizinhas especializadas, sem que decorra qualquer reação inflamatória (Saraste & Pulkki, 2000; Elmore, 2007).

As células em apoptose podem também ser identificadas através das alterações bioquímicas sofridas. A alteração mais importante consiste na clivagem do DNA em regiões internucleossómicas com produção de fragmentos de DNA com 180-200 pares de bases (Hengartner, 2000; Saraste & Pulkki, 2000). Por outro lado, a clivagem do DNA origina inúmeras novas extremidades, que podem ser detetadas através da aplicação da técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*) (Gavrieli *et al.*, 1992). Outra alteração bioquímica importante decorre da exteriorização do fosfolípido fosfatidilserina (PS) para o folheto externo da membrana citoplasmática. Esta característica apoptótica pode ser detetada através da elevada afinidade que a proteína anexina-V apresenta pelo PS na presença de cálcio (van Engeland *et al.*, 1998). A exteriorização do PS encontra-se também envolvida no reconhecimento e fagocitose dos corpos apoptóticos (Fadok *et al.*, 1992).

A maioria das alterações morfológicas e bioquímicas descritas são provocadas por caspases (proteases de cisteína), ativadas especificamente nas células em apoptose e que clivam as suas proteínas-alvo especificamente após resíduos de aspartato (Hengartner, 2000; Riedl & Shi, 2004). São sintetizadas nas células sob a forma de precursores inativos (procaspases) e ativadas, tipicamente, por clivagem proteolítica também a seguir a resíduos de aspartato. A semelhança entre os mecanismos de ativação e de atuação permite a sua ação em cascata. As caspases dividem-se em duas classes: iniciadoras (iniciam a cascata proteolítica) e executoras (efetuem a proteólise celular). As iniciadoras sofrem um processo de auto-ativação por proximidade e clivam as procaspases executoras, ativando-as (Riedl & Shi, 2004).

Nos mamíferos, a resposta apoptótica é essencialmente mediada pela via intrínseca ou extrínseca (ou ambas), consoante a origem do estímulo. A via intrínseca, também designada via mitocondrial, é geralmente acionada em resposta a danos físicos e outros *stresses* que surgem no interior da célula (desarranjo da cadeia de DNA, falta de oxigénio e/ou nutrientes, etc.), enquanto a via extrínseca é acionada pela interação entre ligandos externos e recetores transmembranares. Todavia, ambas as vias convergem na via de execução, onde ocorrem as alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose e que culminam com a degradação final da célula (Riedl & Shi, 2004; Elmore, 2007).

Durante a espermatogénese é essencial a ocorrência de apoptose, quer para ajustar o número de células germinativas passíveis de serem suportadas pelas CS, quer para eliminar células germinativas danificadas ou anormais ([Blanco-Rodríguez, 1998](#)). Na presença de um mecanismo de apoptose eficiente, as células germinativas anormais são eliminadas e os espermatozoides ejaculados deverão ser normais. Sugeriu-se, então, que a presença de espermatozoides no ejaculado expressando marcadores apoptóticos não está associada à apoptose, mas sim que estes espermatozoides são resultado de um mecanismo designado “apoptose abortiva”, que ocorre durante a espermatogénese. Por algum motivo as células germinativas marcadas para morrer escapam ao mecanismo de eliminação, acabando por completar o processo de remodelação que ocorre durante a espermiogénese e que culmina com a diferenciação em espermatozoides. Assim, a presença de espermatozoides com o DNA danificado no ejaculado é resultado de uma tentativa falhada das células germinativas em completar a apoptose ([Sakkas \*et al.\*, 1999](#)).

### **1.6. Fragmentação do DNA em Espermatozoides (sDNAfrag)**

Um elevado número de mulheres não consegue conceber ainda que, aparentemente, não haja qualquer fator de infertilidade associado ao casal. Em muitos destes casos, a explicação pode estar na fraca qualidade genómica dos espermatozoides, impossível de detetar através de um espermograma. Os espermatozoides podem apresentar uma morfologia e motilidade normais e, ainda assim, possuírem danos no DNA. De facto, mais importante que a morfologia e a motilidade dos espermatozoides é a sua habilidade para doar um núcleo incólume capaz de suportar o desenvolvimento de descendência saudável ([Aitken, 2006](#)).

A fragmentação do DNA nos espermatozoides (sDNAfrag) tem sido apontada como um importante marcador de infertilidade masculina. Homens inférteis apresentam níveis significativamente mais elevados de sDNAfrag do que dadores férteis ([Chohan \*et al.\*, 2006](#)). Os danos podem ocorrer tanto a nível nuclear, como mitocondrial, e são induzidos por seis mecanismos principais: “apoptose abortiva” durante a espermatogénese; cortes na cadeia de DNA aquando da remodelação da cromatina na espermiogénese; fragmentação do DNA induzida essencialmente por radicais livres de oxigénio (durante o transporte dos espermatozoides pelos TS e epidídimo); ativação de



caspases e endonucleases endógenas; exposição a tóxicos ambientais; e radio/quimioterapia (Sakkas & Alvarez, 2010).

O aumento do recurso às técnicas de Reprodução Medicamente Assistida (RMA) e a crescente preocupação com a importância que a integridade do genoma dos espermatozoides tem neste contexto levou a que uma série de testes funcionais fossem desenvolvidos para medir a integridade do DNA dos espermatozoides e estudar o seu impacto nas taxas de fertilização, de desenvolvimento embrionário e de gravidez. Contudo, resultados conflituosos têm sido obtidos independentemente do tratamento de RMA utilizado (Chohan *et al.*, 2006; Delbès *et al.*, 2010). À parte da análise de anomalias cromossómicas, a integridade do DNA dos espermatozoides pode ser analisada através da deteção de fragmentação da cadeia de DNA utilizando o teste *single cell gel electrophoresis* (COMET) ou o teste TUNEL; através da avaliação da estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando o teste *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA); ou através da deteção dos níveis de protaminação e compactação da cromatina dos espermatozoides utilizando o teste cromomicina A3 (CMA3).

O teste TUNEL baseia-se na incorporação de nucleótidos deoxyuridina trifosfatados (dUTP), marcados fluorescentemente com isocianato de fluoresceína (FITC), nas extremidades 3'-OH das cadeias de DNA fragmentadas, numa reação enzimática mediada pela enzima transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) (Gavrieli *et al.*, 1992). Os nucleótidos incorporados emitem um sinal, que pode depois ser detetado por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. No segundo caso, a ausência de fluorescência indica que a marcação TUNEL é negativa, ou seja, que o DNA do espermatozoide não se encontra fragmentado; ao passo que a emissão de fluorescência verde é indicativa de marcação TUNEL-positiva, ou seja, que o DNA do espermatozoide se encontra fragmentado. Quanto maior for a fragmentação do DNA mais intensa será a fluorescência emitida. As principais vantagens desta técnica estão associadas ao facto de permitir detetar simultaneamente cortes de cadeia simples e de cadeia dupla do DNA, e não requerer equipamento dispendioso. Por outro lado, esta é uma técnica quantitativa e não qualitativa na medida que revela o número de células com o DNA danificado, mas não o grau de deterioração do mesmo; existindo também algumas variações protocolares entre laboratórios (Shamsi *et al.*, 2008; Zini & Sigman, 2009). Atualmente, não se encontra estabelecido um valor limite para a percentagem de sDNAfrag numa amostra, acima do qual alcançar uma gravidez se torne improvável.

Este valor oscila entre os 12% (Duran *et al.*, 2002) e os 36,5% (Henkel *et al.*, 2003), havendo quem proponha 15% (Benchaiib *et al.*, 2007) e 20% (Sergeie *et al.*, 2005). Esta heterogeneidade de valores pode dever-se a inúmeras razões: diferentes populações de estudo (inseminação intrauterina (IUI), fertilização *in vitro* (IVF) e/ou microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI)); tipo de espermatozoides utilizados (obtidos após lavagem ou selecionados); e ainda ao tipo de contagem (por operador ou citometria de fluxo). É importante referir que embora o TUNEL seja frequentemente utilizado para determinar a apoptose, uma marcação TUNEL-positiva não é sinónima de apoptose, já que danos no DNA induzidos por radicais livres de oxigénio ou radiação ionizante causam igualmente fragmentação do DNA (Negoescu *et al.*, 1998). Com a utilização deste teste, verificou-se que a sDNAfrag não está correlacionada com as taxas de fertilização, mas sim com uma redução significativa das taxas de gravidez, quer em ciclos de IVF, quer em ciclos de ICSI (Henkel *et al.*, 2003). Outros autores encontraram uma relação positiva com a paragem do desenvolvimento embrionário e com a taxa de abortamento, mas apenas em ciclos de ICSI, não tendo sido observada qualquer correlação com as taxas de fertilização e de gravidez, em ciclos de IVF e ICSI (Benchaiib *et al.*, 2007).

O teste COMET permite quantificar e analisar, de forma rápida e sensível, a resposta individual de cada célula quanto aos danos no DNA. Contudo, estes podem ser sobrestimados devido à presença de RNA residual na amostra ou subestimados devido à presença de proteínas, à perda de pequenos fragmentos durante o processo, ou ainda a fragmentos que são demasiado pequenos para serem visualizados. Além disto, uma descondensação incompleta da cromatina pode impedir que os cortes sejam revelados (Shamsi *et al.*, 2008). A utilização do teste COMET demonstrou que uma elevada taxa de sDNAfrag está associada a uma baixa taxa de nados-vivos em ciclos de IVF, mas não em ciclos de ICSI (Simon *et al.*, 2013).

O teste SCSA baseia-se na indução de desnaturação ácida do DNA seguida de coloração metacromática com laranja de acridina (Evenson *et al.*, 1980). Embora estatisticamente seja um teste robusto, o SCSA é uma técnica dispendiosa já que exige a utilização de citometria de fluxo. Por outro lado, trata-se de um método simples e célere para analisar a sDNAfrag (Shamsi *et al.*, 2008). Enquanto uns autores encontraram uma correlação entre a sDNAfrag e os fracos resultados embriológicos e clínicos, tanto em ciclos de IVF como de ICSI (Virro *et al.*, 2004), outros não encontraram qualquer correlação em ambos os tipos de ciclos (Lin *et al.*, 2008).

CMA3 é um fluorocromo que permite identificar anomalias no empacotamento da cromatina dos espermatozoides ocorrido aquando da espermiogénese. Uma vez que se liga especificamente ao DNA em regiões ricas em guanina-citosina, compete com as protaminas por um local de ligação ao DNA (Bianchi *et al.*, 1996). Foi encontrada uma correlação com a diminuição da taxa de fertilização em ciclos de ICSI mas não em ciclos de IVF (Tavalaee *et al.*, 2009).

Apesar dos diferentes testes funcionais revelarem resultados algo controversos, tornou-se evidente que danos no DNA dos espermatozoides têm efeitos adversos nos resultados reprodutivos. Assim, de forma a serem melhoradas as taxas de sucesso nas técnicas de RMA, foram desenvolvidos diversos métodos não-invasivos para selecionar espermatozoides livres de danos no DNA. Alguns destes métodos tiveram, contudo, um sucesso limitado (Henkel, 2012). A aplicação de espermatozoides selecionados morfológicamente (IMSI), que requer o estudo morfológico de organelos em espermatozoides móveis (MSOME), aumentou as taxas de gravidez clínica e de nascidos-vivos mas apenas em casos de recorrentes falhas de implantação embrionária (Boitrelle *et al.*, 2014). A carga elétrica negativa da membrana citoplasmática dos espermatozoides (método Zeta) foi utilizada para isolar espermatozoides maduros, mas este procedimento apenas aumentou as taxas de fertilização (Kheirollahi-Kouhestani *et al.*, 2009). Já o isolamento de espermatozoides maduros através de eletroforese não melhorou os resultados embriológicos (Fleming *et al.*, 2008). Mais, o isolamento de espermatozoides maduros através da deteção de locais de ligação ao ácido hialurónico na sua superfície também não melhorou os resultados clínicos e/ou embriológicos (Tarozzi *et al.*, 2009).

### **1.7. *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS)**

Outro método desenvolvido para selecionar espermatozoides livres de danos no DNA baseia-se na deteção do PS no folheto externo da membrana citoplasmática dos espermatozoides pela anexina-V. Tendo em vista esta afinidade, foi desenvolvida a técnica *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS), que permite isolar espermatozoides que não apresentem o PS no folheto externo da membrana citoplasmática, isto é, espermatozoides viáveis que não se encontrem em apoptose (Grunewald & Paasch, 2013).

O princípio básico desta técnica consiste na incubação dos espermatozoides com uma suspensão de microsferas super-paramagnéticas (50 nm) ligadas a anexina-V. Durante a incubação, as microsferas ligar-se-ão apenas aos espermatozoides com translocação do PS (apoptóticos). Após incubação, a suspensão de espermatozoides é sujeita a uma coluna montada num poderoso íman. A passagem dos espermatozoides por esta coluna origina duas populações distintas: a fração anexina-V positiva (espermatozoides marcados) que fica retida na coluna de separação, e a fração anexina-V negativa (espermatozoides não-marcados) que passa através da coluna e pode depois ser recolhida e processada (Grunewald & Paasch, 2013). Trata-se de um processo simples, rápido e flexível que permite processar mais de  $10^9$  células em apenas 15 minutos sem afetar a viabilidade celular (Miltenyi *et al.*, 1990).

Em RMA, esta técnica tem sido aplicada como complemento das técnicas clássicas de preparação dos espermatozoides (centrifugação por gradientes de densidade (DGC) e *swim-up* (SU)). Estas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de selecionar espermatozoides morfollogicamente normais e com maior motilidade, supostamente capazes de fertilização. A DGC pode ser realizada tanto com gradientes contínuos como descontínuos, ambos constituídos por partículas de sílica. O ejaculado é colocado no topo dos gradientes, seguindo-se uma centrifugação de 15-30 minutos. Durante a centrifugação, os espermatozoides com elevada motilidade deslocam-se ativamente em direção ao gradiente de sedimentação, enquanto aqueles pouco móveis ou imóveis não conseguem penetrar nas fronteiras entre gradientes. Isto resulta na formação de um *pellet* rico em espermatozoides altamente móveis, e na retenção de espermatozoides anormais, imaturos e senescentes, bem como detritos celulares, células epiteliais, bactérias e líquido seminal (Gorus & Pipeleers, 1981). O SU baseia-se no movimento ativo dos espermatozoides através de um meio que os recobre (Mahadevan & Baker, 1984). Este meio é tipicamente rico em glucose, o que promove a capacitação e motilidade dos espermatozoides. Após incubação, os espermatozoides que conseguem migrar ativamente até à superfície são os que possuem melhor morfologia e motilidade, constituindo a fração SU que é depois usada nas técnicas de RMA. Contudo, estas técnicas apresentam limitações, uma vez que não selecionam, necessariamente, os espermatozoides de acordo com a sua competência funcional ou qualidade genética.

A MACS tem sido então utilizada em combinação com a DGC e o SU, sendo o protocolo DGC seguido de MACS (DGC-MACS) o mais estudado. Comparativamente à utilização exclusiva de DGC, a combinação DGC-MACS mostrou aumentar a

viabilidade (Said *et al.*, 2005) e a sobrevivência dos espermatozoides (de Vantéry Arrighi *et al.*, 2009), e diminuir a quantidade de espermatozoides com aneuploidias (Vendrell *et al.*, 2014). Relativamente à motilidade, alguns autores verificaram um aumento da motilidade progressiva com a adição de MACS (Said *et al.*, 2005; 2006; Aziz *et al.*, 2007; de Vantéry Arrighi *et al.*, 2009), enquanto outros verificaram uma diminuição (Grunewald *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Delbes *et al.*, 2013). No que concerne à morfologia, Tavalae *et al.* (2012) verificaram que a aplicação de MACS aumenta este parâmetro, antes ou após a DGC, enquanto outros autores não encontraram qualquer melhoria com a sua adição (Said *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2007), tendo inclusivamente sido encontrada uma diminuição, mas apenas em pacientes normozoospermicos (NZ) (Delbes *et al.*, 2013).

Por outro lado, a combinação DGC-MACS provou ser mais eficiente do que outros procedimentos de separação em providenciar espermatozoides não-apoptóticos, em termos de potencial de membrana mitocondrial intacto, caspase-3 inativa e baixa externalização do PS, tanto em pacientes férteis como inférteis (Said *et al.*, 2006; Aziz *et al.*, 2007; de Vantéry Arrighi *et al.*, 2009; Grunewald *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Vendrell *et al.*, 2014). Ainda com a combinação DGC-MACS, Delbes e colaboradores (2013) verificaram uma melhoria na qualidade da cromatina, através do teste SCSA, contudo, não observaram nenhuma diferença significativa usando o teste CMA3. Por outro lado, Tavalae *et al.* (2012) verificaram que quer DGC-MACS, quer MACS-DGC, forneciam espermatozoides com menor carência de protaminas (teste CMA3).

Relativamente à integridade do DNA, medida pelo teste TUNEL, a fração de espermatozoides selecionados quer por DGC-MACS (Said *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Tavalae *et al.*, 2012; Delbes *et al.*, 2013; Vendrell *et al.*, 2014) quer por MACS-DGC (Tavalae *et al.*, 2012) mostrou-se enriquecida em espermatozoides sem fragmentação do DNA. Contudo, quando Nadalini *et al.* (2011) utilizaram SU após a DGC (DGC-SU) verificaram que a redução de sDNAfrag era significativamente mais elevada do que com a utilização de DGC-MACS.

Em termos de maturidade dos espermatozoides, avaliada pelo teste de ligação ao ácido hialurónico, foi observada uma melhoria com a adição de MACS à DGC (Delbes *et al.*, 2013). De forma semelhante, DGC-MACS também providenciou espermatozoides com elevado potencial de fertilização, medido através da indução da reação acrossómica (Lee *et al.*, 2010) e pela capacidade de penetração dos espermatozoides em ovócitos de hamster (Said *et al.*, 2006). Curiosamente, aplicando

ICSI em hamster, a descondensação da cromatina foi superior quando DGC-MACS foi utilizada, mas apenas em pacientes inférteis (Grunewald *et al.*, 2009). Em dadores férteis, a depleção de espermatozoides apoptóticos não aumentou as taxas de descondensação da cromatina após ICSI (Said *et al.*, 2006).

Alguns resultados clínicos foram também já descritos, sendo que a adição de MACS parece ter pouco impacto na taxa de fertilização e na qualidade embrionária (Dirican *et al.*, 2008; Romany *et al.*, 2012). No entanto, a adição de MACS antes (Dirican *et al.*, 2008) ou após (Khalid & Qureshi, 2011) DGC, ou após SU (Romany *et al.*, 2010; Carchenilla *et al.*, 2013) aumentou a probabilidade de alcançar uma gravidez (Gil *et al.*, 2013), embora Sheikhi *et al.* (2013) tenha encontrado uma melhoria significativa da taxa de fertilização e da qualidade embrionária, mas não na taxa de gravidez. As taxas de implantação, abortamento, e nados-vivos são equivalentes na presença ou na ausência de MACS (Dirican *et al.*, 2008; Khalid & Qureshi, 2011; Romany *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2013). Por último, a utilização do protocolo DGC-MACS conduziu a gravidezes de sucesso e nascimento de nados-vivos em casais com recorrentes falhas em tratamentos de RMA (Polak de Fried & Denaday, 2010; Rawe *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2013).

## 2. Objetivos

Tendo em conta que os estudos até à data realizados sobre MACS não abordaram todas as combinações possíveis da utilização desta técnica juntamente com outras técnicas clássicas de preparação do sémen, incluindo DGC e SU, o primeiro objetivo do presente trabalho foi realizar todas estas combinações e avaliar o seu efeito na redução do número de espermatozoides morfologicamente normais com fragmentação do DNA.

Em segundo lugar, averiguar qual dos protocolos executados era o mais eficaz na redução de sDNAfrag e, se possível, estabelecer uma relação entre os pacientes com maior redução de sDNAfrag e os parâmetros seminais no ejaculado, de forma a restringir a aplicação desta técnica a um determinado tipo de pacientes.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Considerações Éticas

O presente trabalho não envolveu experiências com humanos ou animais. Apenas se utilizaram amostras de sêmen de pacientes que recorreram ao Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros (CGR), Porto, para efetuar espermograma, bem como os dados relativos ao espermograma de cada indivíduo. As amostras e os dados foram utilizados somente após consentimento informado e escrito por parte dos pacientes, de acordo com a Lei Nacional de Procriação Medicamente Assistida ([Lei n.º 32/2006, de 26 de Julho](#)) e com os requisitos do Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida ([CNPMA, 2008](#)).

#### 3.2. Pacientes

As amostras de sêmen utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de 100 indivíduos que recorreram ao CGR, entre Setembro de 2013 e Fevereiro de 2014, para realização de um espermograma. Foi selecionada uma amostra por dia, a primeira que reunisse cumulativamente as características: concentração de espermatozoides  $\geq 10^7/\text{ml}$  (limitação inerente à técnica MACS), e volume de ejaculado  $\geq 1,5 \text{ ml}$ , dado ser necessária uma margem de segurança de 0,5 ml para efetuar o espermograma e 1 ml para o presente estudo.

#### 3.3. Espermograma

As amostras de sêmen foram obtidas por masturbação após 3-5 dias de abstinência sexual. As colheitas de sêmen foram efetuadas para um recipiente de plástico estéril e, imediatamente após a recolha, colocadas sob uma placa de aquecimento (HT 200; [Minitüb, Tiefenbach, Alemanha](#)) a 37°C para promover a liquefação do sêmen. Depois de se confirmar que as amostras reuniam as condições necessárias para serem incluídas neste projeto, uma parte era então cedida para a investigação, servindo a restante para a avaliação dos parâmetros seminais por parte do CGR. O espermograma incluiu a avaliação da cor, consistência, pH e volume do ejaculado, bem como a análise microscópica da concentração, motilidade, vitalidade, hipoosmolaridade e morfologia dos espermatozoides, cujos protocolos se encontram no **Anexo II** ([WHO, 2010](#)). Estes dados foram mais tarde comunicados pelo CGR, para efeitos de correlações estatísticas no trabalho.



### 3.4. Desenho Experimental

Após um transporte de 30 minutos, onde as amostras seguiram devidamente protegidas e à temperatura ambiente (TA), estas foram processadas no Laboratório de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto. O processamento das amostras foi realizado segundo um de cinco protocolos distintos, representados no **Diagrama 1**. Diariamente o protocolo a realizar foi escolhido aleatoriamente, mas de forma a que em cada semana todos os cinco protocolos fossem realizados. Deste modo, por cada protocolo, um controlo e quatro experimentais, foram processadas as amostras de 20 indivíduos. No grupo controlo (**Grupo 1**), as amostras foram processadas de acordo com as técnicas clássicas de preparação do sémen (DGC seguida de SU). Nos grupos experimentais (Grupos 2-5), as amostras foram adicionalmente tratadas com a tecnologia MACS, diferindo entre os grupos o momento de aplicação da técnica: após DGC (**Grupo 2**), após SU (**Grupo 3**) ou previamente a DGC (**Grupo 4**). No **Grupo 5**, a DGC não foi realizada e a MACS foi aplicada antes do SU.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Sémen <sup>T0</sup> (n = 20)	Sémen <sup>T0</sup> (n = 20)	Sémen <sup>T0</sup> (n = 20)	Sémen <sup>T0</sup> (n = 20)	Sémen <sup>T0</sup> (n = 20)
↓	↓	↓	↓	↓
DGC	DGC	DGC	MACS	MACS
↓	↓	↓	↓	↓
SU <sup>T1</sup>	MACS	SU	DGC	SU <sup>T1</sup>
	↓	↓	↓	
	SU <sup>T1</sup>	MACS <sup>T1</sup>	SU <sup>T1</sup>	

**Diagrama 1.** Protocolo experimental. Metodologias clássicas para processamento de sémen (Grupo 1) e em combinação com a técnica *Magnetic-Activated Cell Sorting* (MACS) (Grupos 2-5).

T0 e T1: momentos em que foi realizado um esfregaço para posterior determinação da fragmentação do DNA nos espermatozoides.

n, número de pacientes estudados; DGC, centrifugação por gradientes de densidade; SU, *swim-up*.

### 3.5. Preparação dos Espermatozoides

Após a liquefação do sémen e remoção do líquido seminal, foi realizado em todas as amostras um esfregaço para posterior determinação da sDNAfrag pela técnica TUNEL, o que constituiu o T0. Neste momento, uma amostra de espermatozoides foi também

retirada para sua visualização ao microscópio ótico invertido (MOI) e respetivo registo fotográfico.

Os protocolos de preparação dos espermatozoides podem ser consultados no **Anexo III**. Resumidamente, o protocolo adotado no Grupo 1 corresponde ao procedimento clássico de preparação de espermatozoides, enquanto os adotados nos restantes grupos (Grupos 2-5) são variantes deste protocolo de acordo com a aplicação da técnica MACS em diferentes etapas do processamento dos espermatozoides (**Diagrama 1**). No final de cada um dos cinco protocolos, uma nova amostra de espermatozoides foi removida para visualização ao MOI e respetivo registo fotográfico e determinação da sDNAfrag (T1).

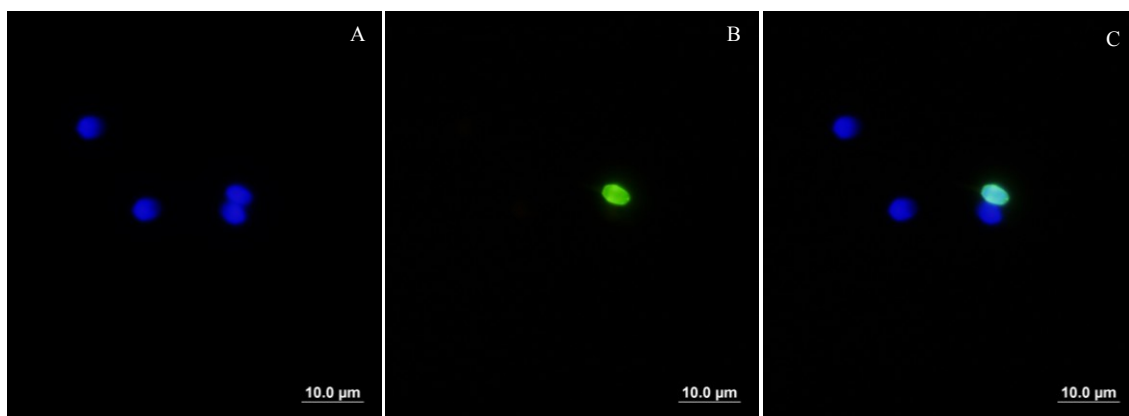
### 3.6. Isolamento de Espermatozoides Não-Apoptóticos (MACS)

A técnica MACS foi utilizada recorrendo ao *Kit Annexin V MicroBead* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) e de acordo com as instruções do fabricante. Após a separação magnética dos espermatozoides, foi retirada uma amostra para visualização ao MOI e respetivo registo fotográfico. O procedimento detalhado da técnica pode ser consultado no **Anexo III**.

### 3.7. Determinação de sDNAfrag (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*)

A sDNAfrag no T0 e no T1 foi determinada pela técnica TUNEL com o auxílio do *Kit In Situ Cell Death Detection* (Roche, Mannheim, Alemanha) e de acordo com as instruções do fabricante para amostras fixadas. O procedimento detalhado da técnica pode ser consultado no **Anexo IV**.

Por cada lâmina (duas por indivíduo: T0 e T1) foram contados, ao microscópio de fluorescência (Leitz DMRBE; Leica, Wetzlar, Alemanha), no mínimo 500 espermatozoides morfológicamente normais a uma ampliação de 1000x, tendo sido feito o respetivo registo fotográfico (câmara DFC480; Leica) (**Figura 3**). Considerou-se que havia fragmentação do DNA (marcação TUNEL-positiva) quando o espermatozoide apresentava fluorescência verde, e ausência de fragmentação (marcação TUNEL-negativa) quando havia ausência de fluorescência verde. Por fim, foi calculada a percentagem de sDNAfrag, pelo número total de espermatozoides contados.



**Figura 3.** Detecção de fragmentação no DNA num espermatozoide morfolologicamente normal pela técnica *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling* (TUNEL).

A – DAPI; B – FITC; C – *MERGE*.

### 3.8. Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando o *software* STATISTICA ([Versão 12; Statsoft, USA](#)). Aplicaram-se os testes Shapiro-Wilk e Levene para verificar a normalidade e a homogeneidade de variâncias, respetivamente. Dado que na maior parte dos casos a normalidade não se verificou, realizaram-se testes não-paramétricos. Porém, como na maioria dos casos se obtiveram resultados idênticos em ambos os testes paramétricos e não-paramétricos, optou-se pela apresentação dos mesmos segundo a forma paramétrica. Nos casos em que se obtiveram resultados diferentes, estes encontram-se apresentados de acordo com a forma não-paramétrica. Procedeu-se à realização de um teste T para amostras emparelhadas, assim como ao seu correspondente não-paramétrico Wilcoxon Matched Pairs Test, para comparar a taxa de sDNAfrag entre as duas populações de espermatozoides analisadas em cada paciente (T0 e T1). Para verificar a existência de diferenças entre os grupos e entre os subgrupos aplicou-se uma análise de variância (ANOVA) a um fator, com análise *post-hoc* pelo teste Tukey (comparação entre grupos independentes). De forma correspondente, utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com análise *post-hoc* pelo teste U de Mann-Whitney. Foram também realizadas correlações lineares e uma análise de covariância entre a redução da percentagem de sDNAfrag e os parâmetros seminais. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes.

## 4. Resultados

### 4.1. Idade, Parâmetros Seminais e sDNAfrag no Ejaculado

Não foram encontradas diferenças significativas entre os cinco grupos relativamente à idade ( $F(4, 95) = 1,057$ ,  $p = 0,382$ ); motilidade progressiva ( $F(4, 95) = 1,697$ ,  $p = 0,157$ ); vitalidade ( $F(4, 95) = 0,247$ ,  $p = 0,911$ ); teste hipoosmótico ( $F(4, 95) = 0,610$ ,  $p = 0,656$ ); morfologia normal ( $F(4, 95) = 0,402$ ,  $p = 0,807$ ); defeitos na cabeça ( $F(4, 95) = 0,324$ ,  $p = 0,861$ ); anomalias na PI ( $F(4, 95) = 1,754$ ,  $p = 0,145$ ) e na cauda ( $F(4, 95) = 0,869$ ,  $p = 0,485$ ); e fragmentação do DNA ( $F(4, 95) = 1,954$ ,  $p = 0,108$ ) (**Tabela 1**). Por outro lado, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas relativamente à concentração ( $H(4, N=100) = 18,386$ ,  $p = 0,001$ ), em que o Grupo 3 apresentou valores inferiores comparativamente aos restantes grupos ( $p < 0,01$ ); e à motilidade progressiva rápida ( $F(4, 95) = 4,168$ ,  $p = 0,004$ ), em que o Grupo 3 apresentou valores inferiores aos registados nos restantes grupos ( $p < 0,05$ ), com exceção do Grupo 5.

**Tabela 1.** Parâmetros seminais dos pacientes e percentagem de fragmentação do DNA no ejaculado.

Parâmetros Seminais	Grupo 1 (DGC-SU)	Grupo 2 (DGC-MACS-SU)	Grupo 3 (DGC-SU-MACS)	Grupo 4 (MACS-DGC-SU)	Grupo 5 (MACS-SU)
Idade (anos)	33,95 ± 5,1	35,65 ± 4,43	34,25 ± 5,98	35,7 ± 4,81	33,1 ± 4,36
Conc (mi/ml)	91,16 ± 49,95 <sup>a</sup>	119,8 ± 106,22 <sup>a</sup>	47,72 ± 37,8 <sup>b</sup>	103,16 ± 54,99 <sup>a</sup>	93 ± 60,74 <sup>a</sup>
MPR (%)	27 ± 9,92 <sup>a</sup>	26,15 ± 12,89 <sup>a</sup>	14,95 ± 13,13 <sup>b</sup>	25,1 ± 8,96 <sup>a</sup>	19,9 ± 10,35 <sup>a,b</sup>
MP (%)	50,2 ± 7,71	47 ± 11,28	50,25 ± 13,07	46,75 ± 9,16	42,75 ± 10,99
VIT (%)	75,85 ± 4,21	75,55 ± 7,36	74,45 ± 11,75	73,8 ± 9,34	73,9 ± 7,92
THO (%)	74,85 ± 7,01	73,95 ± 7,78	70,55 ± 12,02	71,85 ± 11,73	72,05 ± 9,87
MFN (%)	4 ± 2,27	4,25 ± 3,51	3,9 ± 2,71	5 ± 3,46	4,2 ± 3,12
AN cabeça (%)	94,7 ± 2,83	94,95 ± 3,85	94 ± 4,46	93,8 ± 3,79	94,45 ± 3,65
AN PI (%)	40,3 ± 9,14	41 ± 8,61	45,25 ± 10,2	40,8 ± 9,34	46,45 ± 10,89
AN cauda (%)	10,8 ± 5,63	14,3 ± 8,63	15,1 ± 9,3	12,95 ± 6,72	12,8 ± 8,54
sDNAfrag (%)	4,3 ± 2,88	5,03 ± 3,71	8,2 ± 9,16	5,5 ± 4,48	4,28 ± 2,71

Os valores encontram-se expressos em média ± desvio padrão.

Letras diferentes em sobrescrito indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

DGC, centrifugação por gradientes de densidade; SU, *swim-up*; MACS, *Magnetic-Activated Cell Sorting*; Conc (mi/ml), concentração (milhões/ml); MPR, motilidade progressiva rápida; MP, motilidade progressiva; VIT, vitalidade; THO, teste hipoosmótico; MFN, morfologia normal; AN, anomalias; PI, peça intermédia; sDNAfrag, fragmentação do DNA nos espermatozoides.

## 4.2. Redução de sDNAfrag

Todos os grupos apresentaram uma redução significativa na percentagem de sDNAfrag, entre os dois momentos analisados (T0 e T1): Grupo 1 ( $t(19) = 6,15$ ,  $p = 0,000$ ); Grupo 2 ( $t(19) = 5,46$ ,  $p = 0,000$ ); Grupo 3 ( $t(19) = 4,03$ ,  $p = 0,001$ ); Grupo 4 ( $t(19) = 5,48$ ,  $p = 0,000$ ); e Grupo 5 ( $t(19) = 6,37$ ,  $p = 0,000$ ) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Fragmentação do DNA nos espermatozoides no ejaculado (T0) e após tratamento (T1).

sDNAfrag	Grupo 1 (DGC-SU)	Grupo 2 (DGC-MACS-SU)	Grupo 3 (DGC-SU-MACS)	Grupo 4 (MACS-DGC-SU)	Grupo 5 (MACS-SU)
T0 (%)	4,3 ± 2,88*	5,03 ± 3,71*	8,2 ± 9,16*	5,5 ± 4,48*	4,28 ± 2,71*
T1 (%)	1,1 ± 1,23*, <sup>a</sup>	1,03 ± 1,25*, <sup>a</sup>	4,21 ± 5,65*, <sup>b</sup>	1,06 ± 1,28*, <sup>a</sup>	1,18 ± 1,6*, <sup>a</sup>
1 - Rácio (%)	73,36 ± 24,29 <sup>a</sup>	78,92 ± 20,36 <sup>a</sup>	53,83 ± 24,12 <sup>b</sup>	83,31 ± 15,36 <sup>a</sup>	73,53 ± 25,11 <sup>a</sup>
T0 - T1 (%)	3,2 ± 2,33	4,01 ± 3,28	3,99 ± 4,43	4,44 ± 3,63	3,11 ± 2,18

Os valores encontram-se expressos em média ± desvio padrão.

\* Indica diferenças estatisticamente significativas dentro dos grupos ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes em sobrescrito indicam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

sDNAfrag, fragmentação do DNA nos espermatozoides; DGC, centrifugação por gradientes de densidade; SU, *swim-up*; MACS, *Magnetic-Activated Cell Sorting*.

## 4.3. Eficácia da Redução de sDNAfrag

Foram usadas duas abordagens distintas para avaliar se algum dos grupos mostrou maior eficácia na redução da percentagem de sDNAfrag. Dado que o rácio entre fragmentação final e fragmentação inicial (T1/T0) é indicativo da quantidade de sDNAfrag que se mantém na amostra de um paciente, a unidade menos este rácio foi usada como medida da redução percentual de sDNAfrag. Por outro lado, foi também usada a diferença entre fragmentação inicial e final (T0 - T1), indicativa da quantidade de sDNAfrag removidos da amostra. Os valores médios obtidos em cada grupo podem ser consultados na **Tabela 2**.

Utilizando a **abordagem do rácio**, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $F(4,95) = 5,181$ ,  $p = 0,001$ ). Especificamente, o Grupo 3 provou ser menos eficiente na redução da percentagem de sDNAfrag, comparativamente aos restantes grupos ( $p < 0,05$ ). No entanto, utilizando a **abordagem da diferença**, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $F(4,95) = 0,615$ ,  $p = 0,653$ ).

Ainda que a abordagem do rácio não tenha apresentado diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos 1, 2, 4 e 5, o *Effect Size* foi tido em conta para averiguar a existência de significância clínica nalgum dos grupos experimentais. O *Effect Size* é estimado pela diferença das médias dos grupos experimental e controlo, dividida pelo desvio padrão do grupo controlo (Cohen, 1988). Utilizando o Grupo 1 como controlo, e de acordo com as diretrizes de Cohen, encontrou-se um valor próximo a “moderado” ( $d = 0,5$ ) para o Grupo 4 ( $d = 0,41$ ), enquanto o Grupo 2 ( $d = 0,23$ ) e o Grupo 5 ( $d = 0,01$ ) apresentaram valores considerados “pequenos” ( $d = 0,2$ ). Por este método, significância estatística poderia ser obtida se as amostras obtivessem valores “elevados” ( $d = 0,8$ ). Assim, é possível que com um tamanho da amostra mais elevado, o Grupo 4 apresentasse diferenças significativas relativamente aos restantes grupos, quanto à redução da percentagem de sDNAfrag.

#### 4.4. Eficácia da Redução de sDNAfrag e Parâmetros Seminais

A análise correlacional efetuada permitiu detetar diversas relações entre os parâmetros seminais no ejaculado e a redução de sDNAfrag. Usando a **abordagem do rácio**, encontraram-se correlações significativas apenas nos Grupos 1 e 3. Relativamente ao Grupo 1, a redução de sDNAfrag mostrou estar negativamente correlacionada com a motilidade progressiva ( $r = -0,452$ ;  $p = 0,045$ ) e com a vitalidade ( $r = -0,462$ ;  $p = 0,04$ ), enquanto no Grupo 3 estava positivamente correlacionada com a idade ( $r = 0,548$ ;  $p = 0,012$ ). Para os restantes parâmetros seminais (concentração, motilidade progressiva rápida, teste hipoosmótico, morfologia normal, defeitos na cabeça, anomalias na PI e na cauda) não foram encontradas correlações significativas. Usando a **abordagem da diferença**, encontraram-se correlações significativas em todos os grupos, exceto no Grupo 2. No Grupo 1, a redução de sDNAfrag mostrou estar positivamente correlacionada com as anomalias na cauda ( $r = 0,553$ ;  $p = 0,011$ ), enquanto no Grupo 3 mostrou estar negativamente correlacionada com a motilidade progressiva ( $r = -0,451$ ;  $p = 0,046$ ). Já no Grupo 4, foram detetadas fortes correlações negativas com a vitalidade ( $r = -0,842$ ;  $p = 0,000$ ) e teste hipoosmótico ( $r = -0,799$ ;  $p = 0,000$ ), e uma correlação negativa moderada com a motilidade progressiva ( $r = -0,528$ ;  $p = 0,017$ ). No Grupo 5, encontrou-se uma correlação positiva com o número de anomalias na cauda ( $r = 0,563$ ;  $p = 0,010$ ), e uma correlação negativa com a vitalidade ( $r = -0,635$ ;  $p = 0,003$ ). Para os

restantes parâmetros seminais (concentração, motilidade progressiva rápida, morfologia normal, defeitos na cabeça e anomalias na PI) e para a idade não foram encontradas correlações significativas.

Como havia a possibilidade de algum dos parâmetros seminais poder ter influenciado as relações verificadas entre os grupos relativamente à redução da percentagem de sDNAfrag, procedeu-se também a uma análise de covariância. No que concerne a **abordagem do rácio**, as covariáveis concentração ( $F(1, 94) = 6,096$ ,  $p = 0,015$ ) e idade ( $F(1, 94) = 7,835$ ,  $p = 0,006$ ) mostraram estar significativamente relacionadas com os resultados obtidos, mas quando o efeito de ambas foi removido ( $F(4, 94) = 3,309$ ,  $p = 0,014$ ) e ( $F(4, 94) = 4,995$ ,  $p = 0,001$ ) – remoção da concentração e idade, respetivamente), não se verificou nenhuma alteração nos resultados previamente descritos. Isto é, o Grupo 3 continuou a ser o grupo cuja redução de sDNAfrag foi significativamente inferior. Para os restantes parâmetros seminais (motilidade progressiva, motilidade progressiva rápida, vitalidade, teste hipoosmótico, morfologia normal, defeitos na cabeça, anomalias na PI e na cauda) não foi encontrada nenhuma influência significativa. Usando a **abordagem da diferença**, obteve-se um resultado idêntico. As covariáveis motilidade progressiva ( $F(1, 94) = 11,639$ ,  $p = 0,001$ ), vitalidade ( $F(1, 94) = 22,68$ ,  $p = 0,000$ ), teste hipoosmótico ( $F(1, 94) = 11,862$ ,  $p = 0,001$ ) e anomalias na cauda ( $F(1, 94) = 11,2$ ,  $p = 0,001$ ) influenciaram a redução de sDNAfrag, mas esta influência não alterou os resultados obtidos quando os seus efeitos foram removidos ( $F(4, 94) = 1,032$ ,  $p = 0,395$ ), ( $F(4, 94) = 0,7$ ,  $p = 0,594$ ), ( $F(4, 94) = 0,583$ ,  $p = 0,676$ ) e ( $F(4, 94) = 0,483$ ,  $p = 0,748$ ) – remoção da motilidade progressiva, vitalidade, teste hipoosmótico e anomalias na cauda, respetivamente). Para os restantes parâmetros seminais (concentração, motilidade progressiva rápida, morfologia normal, defeitos na cabeça e anomalias na PI) e para a idade não foram encontradas influências significativas.

#### 4.5. Eficácia da Redução de sDNAfrag em Subgrupos

Como os resultados poderiam estar a ser influenciados pelos diferentes graus de severidade dos parâmetros seminais, foi conduzida uma nova análise subdividindo os grupos de acordo com as diferentes patologias encontradas: astenozoospermia (A), teratozoospermia (T) e astenoteratozoospermia (AT) (**Tabela 3**). Dado que existiam

apenas dois pacientes com oligozoospermia, nenhuma comparação pôde ser feita relativamente a este subgrupo.

**Tabela 3.** Redução de espermatozoides com fragmentação do DNA após tratamento (subgrupos).

	<b>Grupo 1</b>		<b>Grupo 2</b>		<b>Grupo 3</b>		<b>Grupo 4</b>		<b>Grupo 5</b>	
	<b>(DGC-SU)</b>		<b>(DGC-MACS-SU)</b>		<b>(DGC-SU-MACS)</b>		<b>(MACS-DGC-SU)</b>		<b>(MACS-SU)</b>	
	(n)	Redução sDNAfrag (%)	(n)	Redução sDNAfrag (%)	(n)	Redução sDNAfrag (%)	(n)	Redução sDNAfrag (%)	(n)	Redução sDNAfrag (%)
<b>A</b>	9	82.94 ± 11.95 <sup>a</sup>	9	78.32 ± 21.44 <sup>a</sup>	16	56.73 ± 24.99 <sup>b</sup>	8	83.01 ± 10.96 <sup>a</sup>	13	67.21 ± 28.04 <sup>a,b</sup>
<b>CR (A)</b>	11	65.52 ± 29.26	11	79.41 ± 20.48	4	42.25 ± 18.44	12	83.51 ± 18.19	7	85.28 ± 13.29
<b>T</b>	9	71.98 ± 22.44	10	79.29 ± 21.31	8	45.36 ± 26.61	8	76.84 ± 17.27	10	65.97 ± 26.5
<b>CR (T)</b>	11	74.48 ± 26.73	10	78.55 ± 20.52	12	59.48 ± 21.62	12	87.62 ± 12.93	10	81.1 ± 22.39
<b>AT</b>	4	78.1 ± 16.93	6	87.54 ± 10.16	5	56.75 ± 24.61	5	81.58 ± 6.44	9	63.9 ± 27.24
<b>CR (AT)</b>	16	72.17 ± 26.12	14	75.23 ± 22.75	15	52.86 ± 24.75	15	83.89 ± 17.52	11	80.91 ± 21.25
<b>Total</b>	20	-	20	-	20	-	20	-	20	-

Os valores encontram-se expressos em média ± desvio padrão.

Letras diferentes em sobrescrito indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

DGC, centrifugação por gradientes de densidade; SU, *swim-up*; MACS, *Magnetic-Activated Cell Sorting*; n, número de pacientes estudados; sDNAfrag, espermatozoides com fragmentação do DNA; CR, controle relativo (todos os outros pacientes que não possuem a patologia considerada).

A, astenozoospermia ( $< 25\%$  motilidade progressiva rápida); CR:  $\geq 25\%$  motilidade progressiva rápida).

T, teratozoospermia ( $< 4\%$  morfologia normal; CR:  $\geq 4$  morfologia normal).

AT, astenoteratozoospermia ( $< 25\%$  motilidade progressiva rápida +  $< 4\%$  morfologia normal; CR:  $\geq 25\%$  motilidade progressiva rápida e/ou  $\geq 4\%$  morfologia normal).

As comparações **entre grupos** revelaram uma diferença significativa apenas nos pacientes com A ( $H(4, N=55) = 10,119$ ,  $p = 0,039$ ). Especificamente, o subgrupo A do Grupo 3 apresentou uma redução de sDNAfrag significativamente inferior à observada nos Grupos 1-4 ( $p < 0,05$ ). Relativamente aos subgrupos T ( $H(4, N=45) = 7,605$ ,  $p = 0,107$ ) e AT ( $F(4, 24) = 2,304$ ,  $p = 0,088$ ) não foram encontradas diferenças significativas. As comparações **dentro dos grupos** não mostraram diferenças significativas entre os subgrupos A, T ou AT, para o Grupo 1 ( $F(2, 21) = 1,843$ ,  $p = 0,183$ ), Grupo 2 ( $F(2, 22) = 0,466$ ,  $p = 0,634$ ), Grupo 3 ( $F(2, 26) = 0,582$ ,  $p = 0,566$ ), Grupo 4 ( $F(2, 18) = 0,472$ ,  $p = 0,631$ ) e Grupo 5 ( $F(2, 29) = 0,039$ ,  $p = 0,962$ ). Por fim, as comparações entre cada subgrupo e o seu **controle relativo** (Tabela 3) também não apresentaram diferenças significativas.



## 5. Discussão

A MACS é uma técnica de separação celular que tem sido cada vez mais utilizada nos estudos sobre sDNAfrag. Na sua maioria, estes estudos processaram as amostras de sémen primeiro com DGC e depois com MACS e, após a aplicação de cada uma das técnicas, mediram a sDNAfrag com o teste TUNEL e compararam os resultados ([Said \*et al.\*, 2006](#); [Lee \*et al.\*, 2010](#); [Vendrell \*et al.\*, 2014](#)). Estudando tanto pacientes férteis ([Said \*et al.\*, 2006](#)) como pacientes com infertilidade idiopática e ciclos de IUI falhados ([Lee \*et al.\*, 2010](#)), foi verificada uma redução de cerca de 30% na quantidade de sDNAfrag. Notavelmente, [Vendrell \*et al.\* \(2014\)](#) conseguiram alcançar uma redução de 96%. Porém, a população de estudo era constituída exclusivamente por 6 pacientes NZ, com níveis patológicos de sDNAfrag. Delbes e colaboradores usaram igualmente este protocolo, mas adicionalmente dividiram a população de estudo em pacientes N, AT e T, e mediram a sDNAfrag também no ejaculado ([Delbes \*et al.\*, 2013](#)). Verificaram que a técnica DGC era significativamente eficaz na redução de sDNAfrag, mas apenas em pacientes AT. Por outro lado, a subsequente adição de MACS permitiu uma redução de 60% nos pacientes NZ, e de 70% nos pacientes T e AT, relativamente à fragmentação detetada no ejaculado. Adicionalmente, [Nadalini \*et al.\* \(2011\)](#) compararam a eficiência deste protocolo (DGC-MACS) com a eficiência do protocolo clássico (DGC-SU). Curiosamente, esta equipa descobriu que a redução de sDNAfrag obtida entre DGC e SU era significativamente maior (40%) à obtida entre DGC e MACS (31%). Outra equipa de investigação, utilizando o protocolo SU-MACS em pacientes cujo sémen possuía mais de 20% de sDNAfrag, observou uma redução de 42% relativamente ao ejaculado ([Carchenilla \*et al.\*, 2013](#)). Por fim, [Tavalaee \*et al.\* \(2012\)](#) dividiram as amostras de sémen de 15 pacientes inférteis em frações e processaram-nas de acordo com diferentes protocolos. Comparativamente à sDNAfrag registada no ejaculado, verificaram uma redução aproximada de 30% com a aplicação exclusiva de DGC e com a aplicação exclusiva de MACS, de 40% com DGC-MACS, enquanto a utilização de MACS-DGC permitiu reduzir para metade o número de sDNAfrag (49%). Dado que o melhor resultado foi obtido com MACS seguido de DGC, a equipa a seguir investigou se este protocolo seria mais eficiente do que o método Zeta ([Zahedi \*et al.\*, 2013](#)). Embora tenham observado uma menor redução de sDNAfrag tanto em pacientes férteis

(35%) como inférteis (30%), não encontraram nenhuma diferença significativa entre os métodos MACS e Zeta.

Dada a grande variedade de protocolos usados e resultados obtidos pelas diferentes equipas de investigadores, tornou-se importante determinar que protocolo é mais eficiente em reduzir a quantidade de sDNAfrag. Para tal, recrutámos 100 pacientes e distribuímos-os aleatoriamente por cinco grupos distintos, os quais abordavam todas as possibilidades de preparação dos espermatozoides com a tecnologia MACS, em combinação com ambas as técnicas DGC e SU. O método clássico de seleção de espermatozoides para ICSI, DGC seguido de SU, continua a ser largamente utilizado. Assim, este foi o protocolo adotado no nosso grupo de referência (Grupo 1). À data, apenas [Nadalini et al. \(2011\)](#) e [Tavalaee et al. \(2012\)](#) compararam este protocolo de referência com um protocolo em que MACS é utilizado, ainda que o protocolo de referência do último grupo fosse composto exclusivamente por DGC. De facto, o protocolo DGC seguido de MACS tem sido amplamente utilizado ([Said et al., 2006](#); [Lee et al., 2010](#); [Nadalini et al., 2011](#); [Tavalaee et al., 2012](#); [Delbes et al., 2013](#); [Vendrell et al., 2014](#)) e, embora nenhuma das equipas tenha realizado o SU, os resultados são comparáveis aos nossos do Grupo 2 (DGC-MACS-SU). Menos abordado foi o protocolo do nosso Grupo 3 (DGC-SU-MACS), cujos resultados são comparáveis apenas com os de [Carchenilla et al. \(2013\)](#), ainda que a equipa não tenha realizado a DGC. O uso de MACS diretamente no ejaculado foi abordado apenas por uma equipa de investigadores ([Tavalaee et al., 2012](#); [Zahedi et al., 2013](#)), que realizou MACS seguida de DGC. Apesar de não terem realizado o SU, os seus resultados são comparáveis aos nossos do Grupo 4 (MACS-DGC-SU). Por último, usámos MACS diretamente no ejaculado, seguido de SU e sem DGC (Grupo 5). Apenas [Tavalaee et al. \(2012\)](#) investigaram esta abordagem, tendo aplicado exclusivamente MACS no ejaculado. Relativamente às medições da sDNAfrag, dois métodos diferentes foram usados: citometria de fluxo ([Said et al., 2006](#); [Lee et al., 2010](#); [Carchenilla et al., 2013](#); [Vendrell et al., 2014](#)) e microscopia de fluorescência. No que diz respeito ao último método, alguns estudos contaram unicamente 200 espermatozoides ([Tavalaee et al., 2012](#); [Delbes et al., 2013](#)), enquanto no nosso trabalho contamos pelo menos 500 espermatozoides, assim como [Zahedi et al. \(2013\)](#). Ademais, apenas espermatozoides morfolologicamente normais foram contados no nosso trabalho.

As taxas médias de redução da percentagem de sDNAfrag obtidas no presente trabalho variaram entre 54% e 83%. No Grupo 1 foi alcançada uma considerável

redução ( $73,36 \pm 24,29\%$ ), bastante superior aos 28% (Tavalaee *et al.*, 2012) e aos 40% (Nadalini *et al.*, 2011) previamente reportados. O SU consiste numa técnica que permite isolar espermatozoides altamente móveis e morfologicamente normais (Oehninger *et al.*, 1990). Além disso, comparativamente à DGC, o SU provou ser mais eficiente em recuperar espermatozoides não-apoptóticos (relativamente à translocação da PS e à fragmentação do DNA) e com maior integridade do DNA (Zini *et al.*, 2000; Lachaud *et al.*, 2004). Assim sendo, a menor taxa de redução obtida por Tavalaee *et al.* (2012) pode ser explicada pela ausência de SU no seu protocolo, cuja adição no nosso caso terá ajudado a restringir uma menor população de sDNAfrag. Por outro lado, enquanto a nossa taxa de redução de sDNAfrag é relativa ao ejaculado, a taxa de redução de Nadalini *et al.* (2011) é relativa ao sémen pós-DGC. Consequentemente, a taxa de redução dada pela DGC não é contemplada, a qual, se tida em conta, poderia aumentar o valor obtido.

Apesar da elevada taxa de redução obtida com o grupo de referência, conseguiu-se um aumento de cerca de 6% com o Grupo 2 ( $78,92 \pm 20,36\%$ ). A maioria dos estudos que realizaram este protocolo obteve uma taxa de redução à volta de 30% (Said *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Nadalini *et al.*, 2011). As exceções verificaram-se nos trabalhos de Tavalaee *et al.* (2012) que obtiveram uma taxa de redução de cerca de 41%, de Delbes *et al.* (2013) que obtiveram uma taxa semelhante mas ligeiramente inferior à nossa, e de Vendrell *et al.* (2014) que obtiveram uma surpreendente taxa de redução (96%) entre DGC e MACS. As baixas reduções obtidas por Said *et al.* (2006), Lee *et al.* (2010) e Nadalini *et al.* (2011) podem, uma vez mais, ser explicadas pelo facto de a redução dada pela DGC não ter sido contemplada, enquanto as taxas de Tavalaee *et al.* (2012) e Delbes *et al.* (2013) poderiam ter sido mais elevadas se os seus protocolos incluíssem o SU. Além disso, ambas as equipas contaram apenas 200 espermatozoides, por conseguinte, as taxas obtidas poderiam ser diferentes se um número mais elevado de espermatozoides tivesse sido contado. Por outro lado, a elevada taxa de redução obtida por Vendrell *et al.* (2014) pode justificar-se pelo tamanho extremamente pequeno da população de estudo (6 pacientes), que apresentavam valores anormais de sDNAfrag após a DGC.

O Grupo 3 apresentou a menor taxa de redução dos cinco grupos ( $53,83 \pm 24,12\%$ ). Dado que nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas relativamente à percentagem de sDNAfrag no ejaculado (T0), não cremos que as significativas menores concentração e motilidade progressiva rápida deste grupo

expliquem a taxa de redução obtida. Consideramos que os espermatozoides recuperados a partir do SU e, portanto, capacitados e maduros, quando sujeitos ao campo magnético da tecnologia MACS ficam sob um enorme *stress*. Em último caso, este *stress* poderá conduzir à apoptose, sendo esta detetada somente pelo TUNEL – e explicando, assim, a menor taxa de redução obtida. Por outro lado, em amostras com má motilidade e/ou concentração, conseguem-se recuperar poucos espermatozoides a partir do SU (Bielfeld *et al.*, 2000), pelo que também poucos espermatozoides estão disponíveis para ser processados por MACS. De facto, este protocolo revelou ser o mais difícil de executar tecnicamente. Os resultados obtidos por Carchenilla *et al.* (2013) (42%) são relativamente concordantes com os nossos, embora o grupo não tenha realizado a DGC.

Apesar de não se ter alcançado significância estatística, o protocolo adotado no Grupo 4 (MACS-DGC-SU) permitiu a maior redução de sDNAfrag ( $83,31 \pm 15,36\%$ ) de todos os grupos. Também no trabalho de Nasr-Esfahani este protocolo apresentou a maior taxa de redução de todos os protocolos (49%) (Tavalaee *et al.*, 2012), embora se tenha verificado um decréscimo nesta redução (32%) no segundo estudo (Zahedi *et al.*, 2013). A eventual utilização de SU talvez aproximasse os valores obtidos por esta equipa à nossa taxa de redução. Por outro lado, a diminuição da taxa de redução no segundo estudo pode dever-se a um maior número de espermatozoides ter sido contado, dado que uma estimativa mais precisa da percentagem de sDNAfrag é obtida se forem contados 500 espermatozoides (Zahedi *et al.*, 2013), em vez de 200 (Tavalaee *et al.*, 2012).

Por último, o nosso Grupo 5 ( $73,53 \pm 25,11\%$ ) apresentou uma taxa de redução de sDNAfrag muito semelhante à obtida no Grupo 1. Isto foi também observado por Tavalaee *et al.* (2012), ainda que a taxa de ambos os protocolos rondasse os 30% e o SU não tivesse sido realizado.

Os nossos resultados mostram que, de facto, MACS é um método eficaz na redução de sDNAfrag, mas é a combinação de MACS com os clássicos DGC-SU (Grupo 4) que permite obter os melhores resultados. O cálculo do *Effect Size* mostrou também que este protocolo é o único com significância clínica “moderada”. Desta forma, é possível que se conseguisse alcançar a significância estatística se o tamanho da amostra fosse maior.

Um estudo correlacional entre os parâmetros seminais do ejaculado e o efeito de MACS foi já anteriormente realizado. Aplicando um protocolo comparável ao nosso do Grupo 2, Lee *et al.* (2010) verificaram que, após DGC e após DGC-MACS, amostras de

sémen com elevados níveis de sDNAfrag estavam correlacionadas com uma baixa motilidade progressiva. No nosso trabalho também se realizou uma análise correlacional sistemática entre os parâmetros seminais do ejaculado e o efeito de MACS, desta feita tendo em conta a redução de sDNAfrag, através das abordagens do rácio e da diferença. Com a primeira abordagem verificámos que amostras com uma maior redução estavam correlacionadas com uma baixa motilidade progressiva e vitalidade (Grupo 2), assim como com um aumento da idade (Grupo 3); com a segunda abordagem, verificámos que amostras com uma maior redução estavam correlacionadas com uma elevada percentagem de anomalias na cauda (Grupos 1 e 5), bem como com uma baixa motilidade progressiva (Grupos 3 e 4), vitalidade (Grupos 4 e 5) e teste hipoosmótico (Grupo 4). Assim, o protocolo do Grupo 4 (MACS-DGC-SU) parece ser o mais adequado para aplicar em amostras de sémen com valores baixos para a motilidade progressiva, vitalidade e teste hipoosmótico, sendo que o protocolo do Grupo 2 (DGC-MACS-SU) é igualmente adequado para amostras com baixa motilidade progressiva e vitalidade. Relativamente a este último protocolo, os nossos resultados para a motilidade progressiva são concordantes com os obtidos por [Lee \*et al.\* \(2010\)](#).

Foi também conduzida uma análise de covariância entre os parâmetros seminais do ejaculado e a redução de sDNAfrag e, embora não tenhamos observado nenhuma alteração nos resultados obtidos, fomos a primeira equipa de investigadores a realizar tal abordagem estatística. Também realizámos uma análise estatística dividindo os grupos de acordo com a severidade dos parâmetros seminais, em subgrupos A, T e AT. Apenas [Delbes \*et al.\* \(2013\)](#) realizaram esta abordagem, cujo trabalho considerou dois subgrupos patológicos (T e AT) e um subgrupo NZ. Apesar de não termos encontrado diferenças significativas entre os subgrupos dentro de cada um dos nossos cinco grupos, os pacientes T tiveram a menor taxa de redução sDNAfrag em três protocolos adotados (Grupos 1, 3 e 4). Contrariamente, [Delbes \*et al.\* \(2013\)](#) verificaram que os pacientes T tiveram aproximadamente a mesma taxa de redução que os pacientes AT.

O presente trabalho permitiu perceber que embora o protocolo clássico de seleção de espermatozoides DGC-SU seja bastante eficaz na redução de sDNAfrag, a aplicação complementar de MACS no ejaculado (antes da DGC e do SU) tem potencial para otimizar a taxa de redução. De forma a confirmar este potencial, sugerimos que um novo estudo seja realizado, desta feita aplicando o protocolo MACS-DGC-SU a um número superior de pacientes. Adicionalmente, de forma a poder ser analisado o impacto que a MACS tem nos parâmetros seminais, estes poderão ser também avaliados

no fim do protocolo. Por último, de forma a avaliar-se o potencial clínico desta técnica, as amostras de sémen processadas poderão ser aproveitadas num contexto clínico. Especificamente, poderá fazer-se uma comparação entre as taxas de fertilização, gravidez e nados-vivos obtidas nestes ciclos, com aquelas obtidas em ciclos anteriores cujo protocolo clássico DGC-SU foi utilizado.

## 6. Bibliografia

Aitken, R. (2006) Sperm function tests and fertility. *Int J Androl* **29**: 69-75

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. *et al.* (2007) Apoptosis. In: *Molecular Biology of the Cell*, Chap. 18, 5<sup>th</sup> edition (Anderson, M. & Granum, S., Eds.). Garland Science, New York, USA, pp. 1115-1129

Amann, R. (2008) The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* **29(5)**: 469-487

ASRM. The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine (2013) Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* **99(1)**: 63

Aziz, N., Said, T., Paasch, U., Agarwal, A. (2007) The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* **22(5)**: 1413-1419

Benchabib, M., Lornage, J., Mazoyer, C., Lejeune, H., Salle, B. *et al.* (2007) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* **87(1)**: 93-100

Bianchi, P., Manicardi, G., Urner, F., Campana, A., Sakkas, D. (1996) Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **2(3)**: 139-144

Bielfeld, P., Babbo, J., Özörnek, H., Krüssel, J., Schuppe, H. *et al.* (2000) A new CentriSwim procedure to increase the recovery of motile spermatozoa. *Andrologia* **33**: 356-359

Blanco-Rodríguez, J. (1998) A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *Int J Androl* **21**: 236-248

Boitrelle, F., Guthauser, B., Alter, L., Bailly, M., Bergere, M. *et al.* (2014) High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: confirmed and potential indications. *Reprod Biomed Online* **28**: 6-13

Campagne, D. (2013) Can male fertility be improved prior to assisted reproduction through the control of uncommonly considered factors? *Int J Fertil Steril* **6(4)**: 214-223

Carchenilla, M., Agudo, D., Rubio, S., Becerra, D., Bronet, F. *et al.* (2013) Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) is a useful technique to improved pregnancy rate in patients with high level of sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* **28**: i118

Chohan, K., Griffin, J., Lafromboise, M., de Jonge, C., Carrell, D. (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* **27(1)**: 53-59

Cohen, J. (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2<sup>nd</sup> edition. Lawrence Erlbaum Associates, New Jersey, USA

de Vantéry Arrighi, C., Lucas, H., Chardonens, D., Agostini, A. (2009) Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 1-12

Delbès, G., Hales, B., Robaire, B. (2010) Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* **16(1)**: 14-22

Delbes, G., Herrero, M., Troeung, E., Chan, P. (2013) The use of complimentary assays to evaluate the enrichment of human sperm quality in asthenoteratozoospermic and teratozoospermic samples processed with Annexin-V magnetic activated cell sorting. *Andrology* **1**: 698-706

Dirican, E., Özgün, O., Akarsu, S., Akın, K., Ercan, Ö. *et al.* (2008) Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of nonapoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* **25**: 375-381



- Duran, E., Morshedi, M., Taylor, S., Oehninger, S. (2002) Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* **17**(12): 3122-3128
- Eddy, E. (2006) The Spermatozoon. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Chap. 1, 3<sup>rd</sup> edition (Neill, J., Eds). Elsevier, St. Louis, USA, pp. 3-54
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495-516
- Evenson, D., Darzynkiewicz, Z. Melamed, M. (1980) Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* **210**: 1131-1133
- Fadok, V., Voelker, D., Campbell, P., Cohen, J., Bratton, D. *et al.* (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**(7): 2207-2216
- Fleming, S., Ilad, R., Griffin, A-M., Wu, Y., Ong, K. *et al.* (2008) Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Hum Reprod* **23**(12): 2646-2651
- Fronczak, C., Kim, E., Barqawi, A. (2012) The insults of illicit drug use on male fertility. *J Androl* **33**(4): 515-528
- Gavrieli, A., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**(3): 493-501
- Gil, M., Sar-Shalom, V., Sivira, Y., Carreras, R., Checa, M. (2013) Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* **30**(4): 479-485

Gomes, M., Gonçalves, A., Rocha, E., Sá, R., Alves, A. *et al.* (2014) Effect of in vitro exposure to lead chloride on semen quality and sperm DNA fragmentation. *Zygote*, available on CJO2014: 1-10

Gorus, F. & Pipeleers, D. (1981) A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* **35**: 662-665

Grunewald, S. & Paasch, U. (2013) Sperm selection for ICSI using Annexin V. *Methods Mol Biol* **927**: 257-262

Grunewald, S., Reinhardt, M., Blumenauer, V., Said, T., Agarwal, A. *et al.* (2009) Increased sperm chromatin decondensation in selected nonapoptotic spermatozoa of patients with male infertility. *Fertil Steril* **92(2)**: 572-577

Hengartner, M. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776

Henkel, R. (2012) Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* **14**: 260-269

Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C. *et al.* (2003) DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* **7(4)**: 477-484

Herrero, M., Delbes, G., Chung, J., Son, W., Holzer, H. *et al.* (2013) Case report: the use of annexin V coupled with magnetic activated cell sorting in cryopreserved spermatozoa from a male cancer survivor: healthy twin newborns after two previous ICSI failures. *J Assist Reprod Genet* **30**: 1415-1419

Holstein, A., Schulze, W., Davidoff, M. (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 107

Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G., Giwercman, A., Kopa, Z. *et al.* (2013) *Guidelines on Male Infertility*. European Association of Urology, Arnhem, Netherlands, 60 pp.

- Kerr, J., Loveland, K., O'Bryan M., de Kretser, D. (2006) Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Chap. 18, 3<sup>rd</sup> edition (Neill, J., Eds.). Elsevier, St. Louis, USA, pp. 827-947
- Khalid, S. & Qureshi, I. (2011) Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms. *Fertil Steril* **96**: S25
- Kheirollahi-Kouhestani, M., Razavi, S., Tavalae, M., Deemeh, M., Mardani, M. *et al.* (2009) Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Hum Reprod* **24**(10): 2409-2416
- Kopera, I., Bilinska, B., Cheng, C., Mruk, D. (2010) Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 1593-1605
- Kühnert, B. & Nieschlag, E. (2004) Reproductive functions of the ageing male. *Hum Reprod Update* **10**(4): 327-339
- Lachaud, C., Tesarik, J., Cañadas, M., Mendoza, C. (2004). Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* **19**(3): 607-610
- Lee, T-H., Liu, C-H., Shih, Y-T., Tsao, H-M., Huang, C-C. *et al.* (2010) Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod* **25**(4): 839-846
- Lin, M-H, Lee, R., Li, S-H., Lu, C-H., Sun, F-J. *et al.* (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* **90**(2): 352-359
- Mahadevan, M. & Baker, G. (1984) Assessment and Preparation of Semen for in vitro Fertilization. In: *Clinical In Vitro Fertilization*, Chap. 7, 1<sup>st</sup> edition (Wood, C. & Trounson, A., Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 83-97

- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**: 231-238
- Muthusami, K. & Chinnaswamy, P. (2005) Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertil Steril* **84(4)**: 919-924
- Nadalini, M., Tarozzi, N., Di Santo, M., Borini, A. (2011) Annexin V magnetic-activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better then the traditional one? *Hum Reprod* **26**: i130
- Negoescu, A., Guillermet, C., Lorimier, P., Brambilla, E., Labat-Moleur, F. (1998) Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* **52**: 252-258
- O'Donnell, L., Meachem, S., Stanton, P., McLachlan, R. (2006) Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Chap. 21, 3<sup>rd</sup> edition (Neill, J., Eds.). Elsevier, St. Louis, USA, pp. 1017-1069
- Oehninger, S., Acosta, R., Morshedi, M., Philput, C., Swanson, R. *et al.* (1990) Relationship between morphology and motion characteristics of human spermatozoa in semen and in the swim-up sperm fractions. *J Androl* **11(5)**: 446-452
- Polak de Fried, E. & Denaday, F. (2010) Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril* **94(1)**: 351.e15-351.e18
- Ragheb, A. & Sabanegh Jr, E. (2009) Smoking and male fertility: a contemporary review. *Arch Med Sci* **5(1A)**: S13-S19
- Rawe, V., Boudri H., Sedó, C., Carro, M., Papier, S. *et al.* (2010) Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* **20**: 320-323

Riedl, S. & Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 897-907

Romany, L., Garrido, N., De Los Santos, M., Aparicio, B., Pellicer, A. *et al.* (2012) Effect of sperm selection by annexin-V sorting prior to ICSI in ovum donation program. Preliminary data. *Reprod Biomed Online* **24**: S2

Romany, L., Meseguer, M., Garcia-Herrero, S., Pellicer, A., Garrido, N. (2010) Magnetic activated sorting selection (MACS) of nonapoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). Preliminary data. *Fertil Steril* **94**: S14

Roosen-Runge, E. (1977) Vertebrata. In: *The Process of Spermatogenesis in Animals*, Chap. 8, 1<sup>st</sup> edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 132-133

Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T. *et al.* (2006) Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* **74**: 530-537

Said, T., Grunewald, S., Paasch, U., Glander, H-J., Baumann, T. *et al.* (2005) Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* **10(6)**: 740-746

Sakkas, D., Mariethoz, E., St. John, J. (1999) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* **251**: 350-355

Sakkas, D. & Alvarez, J. (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* **93(4)**: 1027-1036

Saraste, A. & Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* **45**: 528-537

- Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., Bleau, G. (2005) Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* **20**(12): 3446-3451
- Shamsi, M., Kumar, R., Dada, R. (2008) Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* **127**: 115-123
- Sharlip, I., Jarow, J., Belker, A., Lipshultz, L., Sigman, M. *et al.* (2002) Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* **77**(5): 873-882
- Sheikhi, A., Jalali, M., Gholamian, M., Jafarzadeh, A., Jannati, S. *et al.* (2013) Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure. *Andrology* **1**: 845-849
- Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J. *et al.* (2013) Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* **26**: 68-78
- Tarozzi, N., Nadalini, M., Bizzaro, D., Serrao, L., Fava, L. *et al.* (2009) Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* **19**(3): 35-43
- Tavalaee, M., Razavi, S., Nasr-Esfahani, M. (2009) Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril* **91**(4): 1119-1126
- Tavalaee, M., Deemeh, M., Arbabian, M., Nasr-Esfahani, M. (2012) Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* **29**: 31-38
- Tüttelmann, F. & Nieschlag, E. (2010) Classification of Andrological Disorders. In: *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*, Chap. 4, 3<sup>rd</sup> edition (Nieschlag, E., Behre, H., Nieschlag, S., Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 87-92

van Engeland, M., Nieland, L., Ramaekers, F., Schutte, B., Reutelingsperger, C. (1998) Annexin V-Affinity Assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**: 1-9

Vendrell, X., Ferrer, M., García-Mengual, E., Muñoz, P., Triviño, J. *et al.* (2014) Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. *Reprod Biomed Online* **28**: 492-502

Virro, M., Larson-Cook, K., Evenson, D. (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* **81**(5): 1289-1295

Vogt, P. (2006). Genetics: a Basic Science Perspective. In: *The Sperm Cell*, Chap. 9, 1<sup>st</sup> edition (De Jonge, C. & Barratt, C., Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 217-260

Weinbauer, G., Luetjens, C., Simoni, M., Nieschlag, E. (2010) Physiology of Testicular Function. In: *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*, Chap. 2, 3<sup>rd</sup> edition (Nieschlag, E., Behre, H., Nieschlag, S., Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 11-59

WHO. World Health Organization (1999) Collection and examination of human semen. In: *WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, Chap. 2, 4<sup>th</sup> edition. WHO Press, Geneva, Switzerland, pp. 4-33

WHO. World Health Organization (2010) Semen analysis. In: *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, Chap. 2, 5<sup>th</sup> edition. WHO Press, Geneva, Switzerland, pp. 7-114

Williams, A. & Ford, W. (2001) The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J Androl* **22**(4): 680-695

Zahedi, A., Tavalae, M., Deemeh, M., Azadi, L., Fazilati, M. *et al.* (2013) Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? *J Assist Reprod Genet* **30**: 1181-1186

Zini, A. & Dohle, G. (2011) Are varicoceles associated with increased deoxyribonucleic acid fragmentation? *Fertil Steril* **96(6)**: 1283-1287

Zini, A. & Sigman, M. (2009) Are tests of sperm DNA damage review clinically useful? Pros and cons. *J Androl* **30(3)**: 219-229

Zini, A., Finelli, A., Phang, D., Jarvi, K. (2000) Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* **56**: 1081-1084



# Anexos



**Anexo Ia. Valores de Referência dos Parâmetros Seminais Avaliados  
no Espermograma (WHO, 2010)**

Parâmetro	Valor de Referência
Volume (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Cor	Branco grisalho
Cheiro	<i>Sui generis</i>
Viscosidade	Normal
Liquefação	Completa aos 60 minutos
pH	$\geq 7,2$
Concentração ( $10^6$ espermatozoides/ml)	15 (12-16)
Número total de espermatozoides ( $10^6$ espermatozoides/ejaculado)	39 (33-46)
Motilidade total (progressiva + não progressiva, %)	40 (38-42)
Motilidade progressiva (%)	32 (31-34)
Morfologia normal (%)	4 (3,0-4,0)
Vitalidade (%)	58 (55-63)
Hipoosmolaridade (%)	58 (55-63)

## Anexo Ib. Patologias Associadas à Qualidade dos Parâmetros Seminais (WHO, 2010)

Nomenclatura	Descrição
Normozoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e morfologia normal são iguais ou superiores aos limites inferiores de referência.
Oligozoospermia	O número total de espermatozoides está abaixo do limite inferior de referência.
Azoospermia	Ausência de espermatozoides no ejaculado.
Astenozoospermia	A percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva está abaixo do limite inferior de referência.
Oligoastenoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva estão abaixo dos limites inferiores de referência.
Teratoospermia	A percentagem de espermatozoides morfologicamente normais está abaixo do limite inferior de referência.
Oligoteratoospermia	O número total e a percentagem de espermatozoides morfologicamente normais estão abaixo dos limites inferiores de referência.
Astenoteratoospermia	As percentagens de espermatozoides com motilidade progressiva e com morfologia normal estão abaixo dos limites inferiores de referência.
Oligoastenoteratoospermia	O número total e as percentagens de espermatozoides com motilidade progressiva e com morfologia normal estão abaixo dos limites inferiores de referência.

## **Anexo II. Protocolo de Exame Microscópico de Espermograma**

### **Avaliação da Concentração**

Para determinar a concentração dos espermatozoides é necessário realizar uma diluição adequada da amostra em água, e proceder à contagem dos espermatozoides numa câmara de Neubauer melhorada ([Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemanha](#)). Os espermatozoides foram visualizados num microscópio de contraste de fase (Labophot-2; [Nikon, Tóquio, Japão](#)), a 200x. O cálculo da concentração teve em conta o número de espermatozoides por cada quadrado grande (volume: 0,1 µl) da câmara de Neubauer, o fator de diluição aplicado e a conversão para a unidade pretendida (ml). Foram contados apenas os espermatozoides intactos, isto é, com cabeça, PI e cauda.

O número total de espermatozoides por ejaculado é calculado pelo volume (em ml) e a concentração em milhões/ml.

### **Avaliação da Motilidade**

No início da análise microscópica do ejaculado, 10 µl da amostra são colocados entre lâmina e lamela para determinar a motilidade. A observação foi feita ao microscópio de contraste de fase (ampliação de 400x) e foram avaliados entre 100 e 200 espermatozoides. As percentagens para cada categoria de motilidade (progressiva rápida, progressiva lenta, não progressiva e nula) foram calculadas com a ajuda de um contador manual de laboratório ([Digisystem Laboratory Instruments Inc., Taipei, República da China](#)).

### **Avaliação da Vitalidade**

No teste da vitalidade é necessário preparar previamente uma solução de Eosina Y a 0,5% através da adição de 0,2 g de Eosina Y ([Merck, Darmstadt, Alemanha](#)) a 40 ml de soro fisiológico ([Labesfal, Carnaxide, Portugal](#)). De seguida, são adicionados 50 µl da amostra a 50 µl de solução de Eosina Y, colocando-se depois uma gota entre lâmina e lamela. Ao microscópio com campo brilhante (ampliação de 400x), foram contados entre 100 e 200 espermatozoides, com um contador manual de laboratório. O resultado é expresso como a percentagem de espermatozoides vivos (não corados pela Eosina Y), pelo total de espermatozoides contados.

### **Avaliação da Hipoosmolaridade**

O soluto hipoosmótico utilizado nesta avaliação é resultado da adição de 0,735 g de citrato de sódio dihidratado ([Sigma](#), [Steinheim](#), [Alemanha](#)) e 1,351 g de D-frutose ([Sigma](#)) a 100 ml de água destilada, sendo mantido a 4°C. Para a avaliação deste parâmetro são adicionados 50 µl da amostra a 500 µl de solução hipoosmótica, incubando-se de seguida a 37°C, durante 30-120 minutos. De seguida, coloca-se uma gota entre lâmina e lamela e procede-se à visualização dos espermatozoides ao microscópio, numa ampliação de 400x. Foram contados entre 100 e 200 espermatozoides, com um contador manual, sendo o resultado dado em percentagem de espermatozoides reativos no total de espermatozoides contados.

### **Avaliação da Morfologia**

Para a avaliação morfológica é necessário efetuar um esfregaço com uma gota do ejaculado liquefeito (5-10 µl). Após estar seca, mergulha-se a lâmina em etanol 96% durante 15 minutos, permitindo a desidratação e a fixação das células. Segue-se a coloração das células, através da coloração Papanicolau. Após nova desidratação em etanol 50% durante 2 a 3 minutos, coloca-se em água destilada durante 10 segundos, e coram-se os núcleos com Hematoxilina de Harris ([Merck](#)) durante 8 minutos. Posteriormente imerge-se a lâmina 4 vezes em etanol ácido, seguido de lavagem em água corrente durante 5 minutos, permitindo a remoção da Hematoxilina em excesso. Após desidratação numa série crescente de etanol (50, 70, 80 e 96%), cora-se o citoplasma com Orange G-6 ([Merck](#)) durante 4 minutos. De seguida, passa-se a lâmina 2 vezes em etanol 96% durante 10 segundos, e em EA-50 ([Sigma](#)) durante 5 minutos. Por fim, coloca-se a lâmina novamente em etanol a 96%.

A lâmina é depois observada ao microscópio de campo brilhante, numa ampliação de 1000x, sendo classificados entre 100 e 200 espermatozoides. Foram contados os espermatozoides morfolologicamente normais e anormais, sendo que por cada espermatozoide anormal foram registados os seus defeitos. Estes podem incluir anomalias na cabeça, na PI ou na cauda, e ainda a presença de restos citoplasmáticos. Por fim, obtém-se o índice de teratozoospermia, que consiste no número médio de anomalias por espermatozoide anormal.

### Anexo III. Protocolo de Preparação do Sémen

#### Material:

- Tubos de centrífuga (Ref: 391-8506; [Nunc, Roskild, Dinamarca](#))
- *Sperm preparation medium* (SPM; Ref: 10690060A; [Medicult Origio, Jyllinge, Dinamarca](#))
- *Universal IVF medium* (meio IVF; Ref: 10300060A; [Medicult Origio](#))
- Gradientes (*PureSperm* 100; Ref: PS100-100; [Nidacon, Gothenburg, Suécia](#))
- *Kit Annexin V MicroBead* (Ref: 130-090-201; [Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha](#))
- Coluna de separação *Magnetic-Activated Cell Sorting* MS (MACS; Ref: 130-042-201; [Miltenyi Biotec](#))
- Aparelho MACS *MultiStand* (Ref: 130-042-303; [Miltenyi Biotec](#))
- Câmara de fluxo laminar horizontal classe II (BBH6; [Braun Horizontal, Andover, Reino Unido](#))
- Incubadora (MCO-19AIC UV; [Sanyo, Nijverheidsweg, Holanda](#))
- Centrífuga (GP; Cat. No. 355953; [Beckman, Glenrothes, Reino Unido](#))
- Microscópio ótico invertido (MOI) com ótica Hoffmann (CKX41; [Olympus, Tóquio, Japão](#))
- Câmara digital (DP21; [Olympus](#))

#### **Preparação da coluna de gradientes:**

Os gradientes encontram-se conservados a 4°C e são colocados 20 minutos à TA antes de serem utilizados nas experiências.

1. Colocar 1,5 ml do gradiente 45% (0,675 ml *PureSperm* + 0,825 ml SPM) num tubo de centrífuga.
2. Adicionar 1,5 ml do gradiente 90% (1,35 ml *PureSperm* + 0,15 ml SPM) no fundo do tubo que já contém o gradiente 45%, muito cuidadosamente para os gradientes não se misturarem.

**Grupo 1 (Sémen – Gradientes – *Swim-up*)**

1. Liquefação do sémen durante o transporte do CGR para o ICBAS. Se não ficar totalmente liquefeito, colocar na incubadora a 37°C, até estar totalmente liquefeito.
2. Adicionar 2 ml de SPM a 37°C e 6% CO<sub>2</sub>.
3. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, para remoção do líquido seminal, e descartar o sobrenadante.
4. Adicionar 1,5 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
5. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI. Retirar nova amostra de 10 µl para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“RAW”).
6. Adicionar cuidadosamente a amostra ao topo da coluna de gradientes.
7. Centrifugar 20 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
9. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (1ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
11. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (2ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
12. Adicionar 500 µl de meio IVF a 37°C e 6% CO<sub>2</sub> sobre o *pellet*, devagar para não ressuspender.
13. Incubar durante 60 minutos à TA para efetuar o SU. Ao fim deste tempo, o topo contém a fração de espermatozoides capacitados.
14. Retirar uma amostra de 10 µl do topo, com muito cuidado para não agitar, e colocar entre lâmina e lamela. Observar ao MOI e fotografar. Se houver espermatozoides suficientes para TUNEL, retirar nova amostra de 10 µl do topo para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“SWUP”). Se os espermatozoides não forem suficientes, colher a amostra numa porção inferior e repetir o procedimento. Se ainda assim a quantidade de espermatozoides for insuficiente para TUNEL, agitar tudo e então retirar uma amostra de 10 µl para fazer o esfregaço.



## **Grupo 2 (Sémen – Gradientes – MACS – *Swim-up*)**

1. Liquefação do sémen durante o transporte do CGR para o ICBAS. Se não ficar totalmente liquefeito, colocar na incubadora a 37°C, até estar totalmente liquefeito.
2. Adicionar 2 ml de SPM a 37°C e 6% CO<sub>2</sub>.
3. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, para remoção do líquido seminal, e descartar o sobrenadante.
4. Adicionar 1,5 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
5. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI. Retirar nova amostra de 10 µl para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“RAW”).
6. Adicionar cuidadosamente a amostra ao topo da coluna de gradientes.
7. Centrifugar 20 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
9. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (1ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
11. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (2ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
- 12. Realizar a separação magnética MACS (de acordo com as instruções do comerciante):**
  - Ressuspender o *pellet* em 80 µl da solução tampão;
  - Adicionar 20 µl da solução de microsferas ligadas à anexina-V;
  - Homogeneizar e incubar à TA durante 15 minutos;
  - Adicionar 400 µl da solução tampão;
  - Equilibrar a coluna de separação com 500 µl da solução tampão;
  - Colocar a amostra no topo da coluna para proceder à separação magnética;
  - Recolher a fração resultante da separação para um tubo de centrifuga novo.
13. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI.
14. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
15. Adicionar 500 µl de meio IVF a 37°C e 6% CO<sub>2</sub> sobre o *pellet*, devagar para não ressuspender.

16. Incubar durante 60 minutos à TA para efetuar o SU. Ao fim deste tempo, o topo contém a fração de espermatozoides capacitados.
17. Retirar uma amostra de 10 µl do topo, com muito cuidado para não agitar, e colocar entre lâmina e lamela. Observar ao MOI e fotografar. Se houver espermatozoides suficientes para TUNEL, retirar nova amostra de 10 µl do topo para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“SWUP”). Se os espermatozoides não forem suficientes, colher a amostra numa porção inferior e repetir o procedimento. Se ainda assim a quantidade de espermatozoides for insuficiente para TUNEL, agitar tudo e então retirar uma amostra de 10 µl para fazer o esfregaço.

**Grupo 3 (Sémen – Gradientes – *Swim-up* – MACS)**

1. Liquefação do sémen durante o transporte do CGR para o ICBAS. Se não ficar totalmente liquefeito, colocar na incubadora a 37°C, até estar totalmente liquefeito.
2. Adicionar 2 ml de SPM a 37°C e 6% CO<sub>2</sub>.
3. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, para remoção do líquido seminal, e descartar o sobrenadante.
4. Adicionar 1,5 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
5. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI. Retirar nova amostra de 10 µl para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“RAW”).
6. Adicionar cuidadosamente a amostra ao topo da coluna de gradientes.
7. Centrifugar 20 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
8. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
9. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (1ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
11. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (2ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
12. Adicionar 500 µl de meio IVF a 37°C e 6% CO<sub>2</sub> sobre o *pellet*, devagar para não ressuspender.
13. Incubar durante 60 minutos à TA para efetuar o SU. Ao fim deste tempo, o topo contém a fração de espermatozoides capacitados.
14. Retirar uma amostra de 10 µl do topo, com muito cuidado para não agitar, e colocar entre lâmina e lamela. Observar ao MOI e fotografar.
15. Remover a fração SU, centrifugar 10 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
- 16. Realizar a separação magnética MACS (de acordo com as instruções do comerciante):**
  - Ressuspender o *pellet* em 80 µl da solução tampão;
  - Adicionar 20 µl da solução de microsferas ligadas à anexina-V;
  - Homogeneizar e incubar à TA durante 15 minutos;
  - Adicionar 400 µl da solução tampão;
  - Equilibrar a coluna de separação com 500 µl da solução tampão;

- Colocar a amostra no topo da coluna para proceder à separação magnética;
  - Recolher a fração resultante da separação para um *ependorf*.
17. Retirar uma amostra de 10  $\mu$ l e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI. Retirar nova amostra de 10  $\mu$ l para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“MACS”).

**Grupo 4 (Sémen – MACS – Gradientes – *Swim-up*)**

1. Liquefação do sémen durante o transporte do CGR para o ICBAS. Se não ficar totalmente liquefeito, colocar na incubadora a 37°C, até estar totalmente liquefeito.
2. Adicionar 2 ml de SPM a 37°C e 6% CO<sub>2</sub>.
3. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, para remoção do líquido seminal, e descartar o sobrenadante.
4. Adicionar 1,5 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
5. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI. Retirar nova amostra de 10 µl para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“RAW”).
6. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
7. **Realizar a separação magnética MACS (de acordo com as instruções do comerciante):**
  - Ressuspender o *pellet* em 80 µl da solução tampão;
  - Adicionar 20 µl da solução de microsferas ligadas à anexina-V;
  - Homogeneizar e incubar à TA durante 15 minutos;
  - Adicionar 400 µl da solução tampão;
  - Equilibrar a coluna de separação com 500 µl da solução tampão;
  - Colocar a amostra no topo da coluna para proceder à separação magnética.
  - Recolher a fração resultante da separação para um *ependorf*.
8. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI.
9. Adicionar cuidadosamente a fração resultante da separação ao topo da coluna de gradientes.
10. Centrifugar 20 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
11. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
12. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (1ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
13. Adicionar 2 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
14. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm (2ª lavagem) e descartar o sobrenadante.
15. Adicionar 500 µl de meio IVF a 37°C e 6% CO<sub>2</sub> sobre o *pellet*, devagar para não ressuspender.

16. Incubar durante 60 minutos à TA para efetuar o SU. Ao fim deste tempo, o topo contém a fração de espermatozoides capacitados.
17. Retirar uma amostra de 10 µl do topo, com muito cuidado para não agitar, e colocar entre lâmina e lamela. Observar ao MOI e fotografar. Se houver espermatozoides suficientes para TUNEL, retirar nova amostra de 10 µl do topo para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“SWUP”). Se os espermatozoides não forem suficientes, colher a amostra numa porção inferior e repetir o procedimento. Se ainda assim a quantidade de espermatozoides for insuficiente para TUNEL, agitar tudo e então retirar uma amostra de 10 µl para fazer o esfregaço.

**Grupo 5 (Sémen – MACS – *Swim-up*)**

1. Liquefação do sémen durante o transporte do CGR para o ICBAS. Se não ficar totalmente liquefeito, colocar na incubadora a 37°C, até estar totalmente liquefeito.
2. Adicionar 2 ml de SPM a 37°C e 6% CO<sub>2</sub>.
3. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm, para remoção do líquido seminal, e descartar o sobrenadante.
4. Adicionar 1,5 ml de SPM e ressuspender o *pellet*.
5. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI. Retirar nova amostra de 10 µl para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“RAW”).
6. Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
7. **Realizar a separação magnética MACS (de acordo com as instruções do comerciante):**
  - Ressuspender o *pellet* em 80 µl da solução tampão;
  - Adicionar 20 µl da solução de microsferas ligadas à anexina-V;
  - Homogeneizar e incubar à TA durante 15 minutos;
  - Adicionar 400 µl da solução tampão;
  - Equilibrar a coluna de separação com 500 µl da solução tampão;
  - Colocar a amostra no topo da coluna para proceder à separação magnética.
  - Recolher a fração resultante da separação para um tubo de centrifuga novo.
8. Retirar uma amostra de 10 µl e colocá-la entre lâmina e lamela para observar e fotografar ao MOI.
9. Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm e descartar o sobrenadante.
10. Adicionar 500 µl de meio IVF a 37°C e 6% CO<sub>2</sub> sobre o *pellet*, devagar para não ressuspender.
11. Incubar durante 60 minutos à TA para efetuar o SU. Ao fim deste tempo, o topo contém a fração de espermatozoides capacitados.
12. Retirar uma amostra de 10 µl do topo, com muito cuidado para não agitar, e colocar entre lâmina e lamela. Observar ao MOI e fotografar. Se houver espermatozoides suficientes para TUNEL, retirar nova amostra de 10 µl do topo para fazer um esfregaço em lâmina adesivada, para posterior determinação da sDNAfrag. Cada

lâmina é identificada com o código do paciente, a data da experiência e a etapa da experiência (“SWUP”). Se os espermatozoides não forem suficientes, colher a amostra numa porção inferior e repetir o procedimento. Se ainda assim a quantidade de espermatozoides for insuficiente para TUNEL, agitar tudo e então retirar uma amostra de 10 µl para fazer o esfregaço.



## **Anexo IV. Protocolo da Técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*)**

### **Adesivação de lâminas com APES:**

#### **Material:**

- APES (3-Aminopropil-trietoxisilano; Ref: A3648; [Sigma, Steinheim, Alemanha](#));
- Acetona (Ref: 1.00014.1000; [Merck, Darmstadt, Alemanha](#));
- Lâminas (Ref: 100992; [Industrial Quality, Baden-Württemberg, Alemanha](#));
- Água destilada ultrapura (Sistema de purificação de água de osmose inversa Bactágua 100; [Labinox, Gandra, Portugal](#); Filtros 24VDC; [AquaPro, Martinez, USA](#));
- Suporte para lâminas (Ref: 191100; [Vidrolab, Gandra, Portugal](#));
- Tina para lâminas Schiefferdecker (Ref: 44 307 00; [Normax, Marinha Grande, Portugal](#));
- Estufa (P10-112019; [Memmert, Schwabach, Alemanha](#)).

#### **Preparação:**

1. Colocar as lâminas num suporte para lâminas e, durante 5 minutos, imergi-las numa tina com acetona. Deixar secar ao ar.
2. Colocar as lâminas numa tina com a solução APES a 5% (10 ml de APES + 190 ml de acetona), durante 30 minutos. A solução APES deverá ser guardada a 4°C, envolta em papel de alumínio, no máximo durante 2 dias.
3. Lavar as lâminas em água corrente durante 15 minutos.
4. Passar as lâminas por água destilada ultrapura.
5. Secar as lâminas na estufa, a 37°C, de um dia para o outro.
6. Guardar à TA.

**Preparação da solução PBS:****Material:**

- Tampão salino fosfato (PBS; Phosphate Buffer Saline; Ref: P4417; [Sigma](#));
- Água destilada ultrapura (Sistema de purificação de água de osmose inversa Bactágua 100; [Labinox](#); Filtros 24VDC; [AquaPro](#)).

**Preparação (para 1 L):**

1. Dissolver 5 pastilhas de PBS (1 pastilha por cada 200 ml) em 1 L de água destilada ultrapura.
2. Conservar a 4°C.

**Preparação da solução paraformaldeído a 4% em PBS:****Material:**

- Paraformaldeído (Ref: 1.04005.1000; [Merck](#));
- PBS ([Sigma](#));
- Placa de aquecimento Butler (B-9; [ModernHome Electrodomésticos, Linda-a-Velha, Portugal](#));
- Papel de filtro 42 Ashless, diâmetro 18,5 cm ([Whatman, Kent, Reino Unido](#));
- *Hotte* (Ensino 1200; [Industrial Laborum, Albergaria-a-Velha, Portugal](#)).

**Preparação (para 50 ml):**

1. Pesar 2 g de paraformaldeído e adicionar a 50 ml de PBS.
2. Na *hotte*, colocar a solução na placa de aquecimento (máximo 70°C) e mexer lentamente com uma vareta de vidro até a solução ficar transparente (não deixar ferver a solução).
3. Deixar arrefecer e filtrar a solução.
4. Conservar a 4°C, durante 1 mês.

**Preparação da solução citrato de sódio a 0,1% com Triton-X a 0,1%:****Material:**

- Citrato de sódio (Ref: 1.06448.0500; [Merck](#));
- Triton-X (Ref: T8787; [Sigma](#));
- Água destilada ultrapura (Sistema de purificação de água de osmose inversa Bactágua 100; [Labinox](#); Filtros 24VDC; [AquaPro](#)).

**Preparação (para 100 ml):**

1. Pesar 0,1 g de citrato de sódio.
2. Adicionar 0,1 ml de Triton-X e o citrato de sódio a 100 ml de água destilada ultrapura.
3. Conservar a 4°C, durante 1 semana.

**Técnica TUNEL:****Material:**

- *Kit In Situ Cell Death Detection* (Cat. No. 11 684 795 910; [Roche, Mannheim, Alemanha](#));
- Parafilm (“M”; Ref: 358PM-996; [Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA](#));
- Estufa (P10-112019; [Mettler](#));
- DAPI (H-1200; [Vector Laboratories, Burlingame, USA](#));
- Lamelas de vidro 24 x 50 mm (Cat. No. 0101222; [Marienfeld; Lauda-Königshofen, Alemanha](#)).

**Fixação da amostra:**

1. Fazer um esfregaço da amostra em lâmina adesivada com APES e deixar secar à TA.
2. Cobrir a zona da amostra com paraformaldeído a 4% em PBS.
3. Incubar à TA durante 60 minutos.

**Permeabilização:**

4. Lavar em PBS.
5. Permeabilizar as membranas celulares dos espermatozoides com a solução de citrato de sódio a 0,1% com Triton-X a 0,1%, durante 2 minutos a 4°C.
6. Lavar duas vezes em PBS, durante 5 minutos à TA.

**TUNEL:**

7. Escorrer o excesso de PBS à volta da amostra.
8. Adicionar 5 µL de enzima transferase deoxinucleotidil terminal a 45 µL de *label solution* (nucleótidos marcados com FITC) – mistura TUNEL para 2 reações.
9. Adicionar 25 µl da mistura TUNEL na zona da amostra e cobrir com uma lamela de parafilm.
10. Incubar numa câmara escura e húmida, durante 60 minutos a 37°C.

**Lavagens pós-incubação:**

11. Remover a lamela de parafilm e lavar duas vezes em PBS, durante 2 minutos.
12. Deixar secar à TA, adicionar DAPI e cobrir com uma lamela de vidro.

No fim da técnica, as lâminas poderão ser observadas ao microscópio de fluorescência, ou então ser guardadas numa caixa escura, a 4°C, para posterior observação.